

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-205874

(43) 公開日 平成8年(1996)8月13日

| | | | | |
|---------------------------|-------|---------|----------------|--------------------|
| (51) Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | | | |
| C 0 7 H 21/04 | | B | | |
| C 0 7 K 14/195 | | 8517-4H | | |
| C 1 2 N 9/12 | | | | |
| | | 9162-4B | C 1 2 N 15/ 00 | Z N A A |
| | | 審査請求 有 | 請求項の数25 | OL (全 52 頁) 最終頁に続く |

(21) 出願番号 特願平7-268879

(22) 出願日 平成7年(1995)10月17日

(31) 優先権主張番号 3 2 4 4 3 7

(32) 優先日 1994年10月17日

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(31) 優先権主張番号 3 3 7 6 1 5

(32) 優先日 1994年11月10日

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(31) 優先権主張番号 9 4 2 0 3 4 3 3 . 1

(32) 優先日 1994年11月24日

(33) 優先権主張国 イギリス (GB)

(71) 出願人 591204355

プレジデント・アンド・フェローズ・オブ・ハーバード・カレッジ

PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE

アメリカ合衆国02138マサチューセッツ州ケンブリッジ、クインシー・ストリート17番

(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

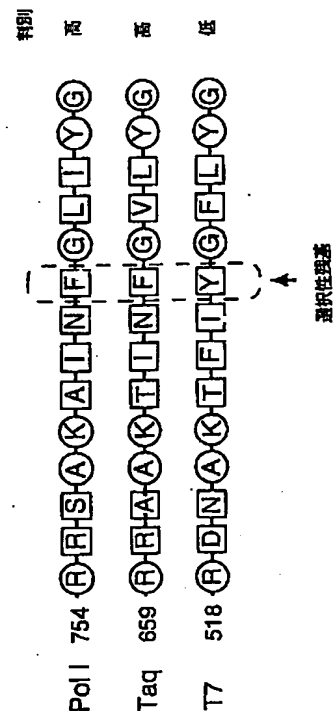
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾されたヌクレオチド結合部位を有するDNAシーケンシング用のDNAポリメラーゼ

(57) 【要約】

【課題】 DNAシーケンシング用の有用なDNAポリメラーゼを提供すること。

【解決手段】 対応する天然に存在するDNAポリメラーゼの能力と比較して、対応するデオキシヌクレオチドに対してジデオキシヌクレオチドまたは他のデオキシヌクレオチド類似体を取り込む能力を増加させるように修飾されているDNAポリメラーゼ。



【特許請求の範囲】

【請求項1】対応する天然に存在するDNAポリメラーゼの能力と比較して、対応するデオキシヌクレオチドに対してジデオキシヌクレオチドまたは他のデオキシヌクレオチド類似体を取り込む能力を増加させるように修飾されているDNAポリメラーゼ。

【請求項2】対応する天然に存在するDNAポリメラーゼの能力と比較して、対応するデオキシヌクレオチドに対してジデオキシヌクレオチドを取り込む能力を増加させるように、ポリメラーゼのジデオキシヌクレオチド結合部位中において修飾されているDNAポリメラーゼ。

【請求項3】ポリメラーゼのジデオキシヌクレオチド結合部位中において、天然に存在するアミノ酸の代わりにチロシンを有するDNAポリメラーゼ。

【請求項4】対応する天然に存在するDNAポリメラーゼの能力と比較して、対応するデオキシヌクレオチドに対してジデオキシヌクレオチドを取り込む能力を少なくとも20倍増加させるように修飾されているDNAポリメラーゼ。

【請求項5】デオキシヌクレオチドとジデオキシヌクレオチドとを100倍未満で区別するDNAポリメラーゼ。

【請求項6】唯一の二価カチオンとしてのマグネシウムの存在下に、dNMPと比較してddNMPを100倍未満で判別する好熱性DNAポリメラーゼ。

【請求項7】*Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermus flavus*, *Bacillus stercorarius*, *Thermococcus litoralis*, および *Pyrococcus furiosus* からなる群より選択される生物に由来する、請求項6記載のDNAポリメラーゼ。

【請求項8】残基667においてチロシンを有する、*Thermus aquaticus* DNAポリメラーゼ。

【請求項9】大腸菌DNAポリメラーゼの残基762の類似位置にチロシン残基を有する、天然に存在しないPol I型DNAポリメラーゼ。

【請求項10】デオキシヌクレオチド結合部位においてアミノ酸配列KN₁N₂N₃YN₆N₇YG/Q（式中、各々のNは独立して任意のアミノ酸である）を含む、Pol I型DNAポリメラーゼ。

【請求項11】DNAシーケンシングにおいて用いることが可能なように十分に低いエキソヌクレアーゼ活性を有する、請求項1-10のいずれかに記載のDNAポリメラーゼ。

【請求項12】100未満の平均連続移動性を有する、請求項1-11のいずれかに記載のDNAポリメラーゼ。

【請求項13】大腸菌のDNAポリメラーゼIの666

-682、710-755、755-784、798-867および914-928に対応する領域から選択される領域中のアミノ酸において修飾されているPol I型DNAポリメラーゼ。

【請求項14】配列KN₁N₂N₃N₆N₇YG（式中、各々のNは独立して任意のアミノ酸である）を有し、ここで前記Nの1つはddNMPの取り込みに対する判別がdNMPの取り込みの50倍より多くないポリメラーゼを与えるように修飾されていることを特徴とするDNAポリメラーゼアルファ。

【請求項15】非変異ポリメラーゼと比較して少なくとも20倍以上効率的にddNMPを取り込むポリメラーゼを与えるようにN₁からN₆のいずれかにおいて修飾されている、請求項14記載のDNAポリメラーゼアルファ。

【請求項16】請求項1-15のいずれかに記載のDNAポリメラーゼをコードするポリヌクレオチド。

【請求項17】請求項1-15のいずれかに記載のDNAポリメラーゼを製造する方法であって、

(a) DNAポリメラーゼをコードする核酸分子を用意し；

(b) ヌクレオチド塩基配列内の1つまたはそれ以上の部位における1つまたはそれ以上の塩基を変更させるように該核酸分子に突然変異を起こさせ；そして

(c) 該変異させた核酸分子により発現される修飾されたDNAポリメラーゼを回収する；各工程を含む方法。

【請求項18】ジデオキシシーケンシングによりDNA分子のヌクレオチド塩基配列を決定する方法であって、鎖伸長に用いられる酵素が請求項1-15のいずれかに記載のDNAポリメラーゼであることを特徴とする方法。

【請求項19】前記DNAポリメラーゼが熱安定性DNAポリメラーゼであり、前記シーケンシングが50℃より高い温度において実施される、請求項18記載の方法。

【請求項20】核酸のシーケンシング方法であって、オリゴヌクレオチドプライマー、シーケンスされるべき核酸、1および4の間のデオキシリボヌクレオシド三リン酸、請求項1-15のいずれかに記載のDNAポリメラーゼおよび異なる量の少なくとも2つの鎖停止剤を、該オリゴヌクレオチドプライマーが伸長してシーケンスされるべき核酸に相補的な核酸断片を形成するのに好ましい条件下に混合し；大きさにより核酸断片を分離し；そして核酸配列を決定し、ここで該試薬はプライマー伸長生成物中の標識の強度により互いに異なる；各工程を含む方法。

【請求項21】請求項1-15のいずれかに記載のDNAポリメラーゼを用いることを特徴とするサイクルシーケンシング方法。

【請求項22】サイクルシークエンシング反応において4つのd d N T Pの各々に対し過剰量または同量の4つのd N T Pを用意し；そして該サイクルシークエンシング反応を実施する；の各工程を含む、請求項21記載のサイクルシークエンシング方法。

【請求項23】サイクルシークエンシング反応において対応するデオキシヌクレオチドと比較して10倍未満の量の4つすべての蛍光標識したジデオキシヌクレオチドを用意し；そして該サイクルシークエンシング反応を実施する；の各工程を含む、請求項21記載のサイクルシークエンシング方法。

【請求項24】請求項1-15のいずれかに記載の修飾されたDNAポリメラーゼを含むことを特徴とする、DNAシークエンシング用キット。

【請求項25】自動化DNAシークエンシング装置であって、1つのプライマーおよびDNA鎖から形成される少なくとも二つのシリーズのDNA生成物を提供する試薬を含む反応器、ここで該試薬は請求項1-15のいずれかに記載のDNAポリメラーゼを含み、該シリーズの該DNA生成物の各々は分子量が異なりかつ1つの末端に鎖停止剤を有しており；分離装置の1つの軸に沿って該DNA生成物を分離し一連のバンドを形成させるための分離手段、ここで1つのシリーズ中の実質的にすべての近傍バンドの強度はほぼ同一であり、任意のシリーズ中の実質的にすべての近傍バンドの強度は他のシリーズのものとは異なり；軸に沿って分離した後に各々のバンドの位置および強度を決定するためのバンド読みとり手段；および分離手段中に存在しているであろう標識からの光放出の波長からではなく軸に沿ったバンドの位置および強度のみからDNA鎖のDNA配列を決定するコンピュータ手段；を含むことを特徴とする装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はDNAシークエンシングおよびDNAシークエンシングのための自動化されたおよび手動の方法に適するDNAポリメラーゼに関する。

【0002】本発明はTaborおよびRichardsonにより”DNAシークエンシングのための修飾ヌクレオチド結合部位を持つDNAポリメラーゼ”と題され、1994年10月17日に出願されたものの一部継続出願であり、その全文は（図を含め）ここに引例として含まれている。

【0003】本発明は米国エネルギー省（契約番号 D E - F G 0 2 - 8 8 E R 6 0 6 8 8）からの基金を含む政府の援助を受けている。米国政府は本発明にある種の権利を持つであろう。

【0004】

【従来の技術】以下にDNAシークエンシング技術に関する簡単な説明を記載する。これは本出願を読む人のた

めの一般的なガイドとして提供されているものであり、ここに引用されたまたは明白にまたは暗黙のうちに参考にされた技術が付随する請求の範囲に対する先行技術であることを容認するものではない。

【0005】一般的に、DNAシークエンシングにおいては、一つの決められた末端および一つの変位の末端を持つ一本鎖DNA断片の4つの集団を発生させる。変位の末端は一般的に特定のヌクレオチド塩基（グアニン（G）、アデニン（A）、チミン（T）またはシトシン（C））で終結する。4つの異なる断片の組は各々それらの長さに基づいて分離され（一つの方法では高分解能ポリアクリルアミドゲル上で）；ゲル上の各々のバンドはDNA配列中の特定のヌクレオチドに共直線性に対応しており、従って与えられたヌクレオチド塩基の配列中における位置が同定される。TaborおよびRichardson, 米国特許第4,942,130および4,962,020号参照。

【0006】DNAシークエンシングには二つの一般的方法がある。一つの方法（MaxamおよびGilbertシークエンシング）では、単離されたDNA断片を化学的に分解し、各々がその決められた末端で単一の放射性標識で標識され、各々の反応により四つの塩基（G、A、TまたはC）のうち一つまたはそれ以上の塩基で特異的に制限切断される。もう一つの方法（ジデオキシまたは鎖停止シークエンシング）ではDNA鎖の酵素的合成が行われる。Sanger et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74:5463, 1977)。一般的に四つの別々の合成が行われ、各々の反応はジデオキシヌクレオチドのような適当な鎖停止ヌクレオチドの取り込みにより特定の塩基（G、A、TまたはC）において停止する。放射活性標識ヌクレオチド三リン酸の取り込みによりDNA断片が均一に標識され（末端標識のかわりに）、従ってより大きなDNA断片はより放射強度が増加するので後者の方法が好適である。さらに、³²P標識ヌクレオチドのかわりに³⁵S標識ヌクレオチドが使用できるのでより鋭敏な決定ができ；各々のレーンはG、A、TまたはCのみに対応するので反応生成物をより簡単に解析することができる。ほとんどのジデオキシシークエンシングに利用される酵素はT7 DNAポリメラーゼおよびTaq、Vent、Tthその他のような好熱性生物から単離されたDNAポリメラーゼである。頻度は低いが使用されるその他のポリメラーゼにはAMV逆転写酵素および大腸菌DNAポリメラーゼIのクレノー断片などが含まれる。

【0007】ジデオキシ鎖停止法においては短い一本鎖プライマーを一本鎖テンプレートにアニールさせる。プライマーはジデオキシヌクレオチド（d d N M P）が取り込まれるまでデオキシヌクレオチド（d N M P）を取り込んでその3'末端において伸長する。d d N M Pが取り込まれたときその塩基で伸長が止められる。d d N T Pのかわりにその他の鎖停止剤を使用することができ、およびd d N T Pは以下に説明するように標識する

ことができる。

【0008】上記の方法論を用いて、DNA配列分析のための自動化システムが開発されてきた。EG&Gにより製造された一つの装置は放射標識ヌクレオチドを用いる伝統的なジデオキシ鎖停止反応を使用した。生じたDNA生成物はゲル電気泳動により分離された。Toneguzzo et al, 6 *Biotechniques* 460, 1988. 検出器はゲルの底を通過しながら放射活性をスキャンする。配列決定されるべき各々のテンプレートに対し四つの合成反応が、ならびに各々のゲル上に四つのレーンが必要とされ、各々の特定の鎖停止剤により停止された生成物のため別々のレーンが使用された。

【0009】Kambara et al, 6 *Biotechnology* 816, 1988, は蛍光標識プライマーを使用した。生じた蛍光標識生成物はゲルの底でレーザーで励起され、CRTモニターで蛍光が検出された。この方法もまた、配列決定されるべき各々のテンプレートに対し四つの合成反応およびゲル上の四つのレーンを必要とする。

【0010】Applied Biosystemsは、各々が異なる蛍光マーカーで標識されている四つの異なるプライマーを使用する装置を製造している。Smith et al., 13 *Nuc. Acid. Res.* 2399, 1985; および321 *Nature* 674, 1986. 各々のプライマーは四つのジデオキシヌクレオチドの内の一つを含む別々の反応において使用される。四つの反応を実施した後、混合物を合わせ、ゲル上の単一のレーンでDNA断片を分画する。蛍光生成物をゲルを通して電気泳動した後、ゲルの底においてレーザーを用いてこれを検出する。このシステムは各々のテンプレートについて四つの別々のアニール反応および四つの別々の合成反応を必要とするが、ゲル上の単一のレーンしか必要としない。単一のレーンに四つ全てのバンドがあるため配列のコンピューター分析がより容易である。

【0011】DuPontは異なる蛍光マーカーが四つのジデオキシヌクレオチド三リン酸の各々に結合された装置を提供していた。Prober et al., 238 *Science* 336, 1987. 単一のアニール工程、単一のポリメラーゼ反応（四つの標識ジデオキシヌクレオチド三リン酸の各々を含む）、およびシーケンシングゲルに単一のレーンしか必要としない。DNA生成物中の四つの異なる蛍光マーカーはゲルにより電気泳動されながら別々に検出される。

【0012】Englert et al., 米国特許第4,707,235号（1987）は、実質的にゲルの全幅にわたって配置された検出手段を有し、四つの別々のレーンにおいて検出手段を通り過ぎて移動する標識DNA生成物を検出することができ、かつ試料が位置しているチャンネルまたはレーンを同定するマルチチャンネル電気泳動装置について記載している。

【0013】DNA配列分析に現在使用されている方法に固有なものとして、ポリアクリルアミドゲル電気泳動

のようなゲル浸透法により放射性または蛍光標識DNA生成物を分離し、続いてゲル中の移動の軸に沿ってお互いに関してのそれらの位置を検出する必要がある。この方法の正確度は、部分的にはゲルを通してほとんど同じ距離を浸透したバンド中の信号の均質性により決定される。近くのバンド間の信号強度の相違または変異はいくつかの問題を生じる。第一に、最も弱い信号を含むバンドを検出する能力により制限されている本方法の感度を低下させる。第二には、弱い信号が鎖停止剤の取り込みによる真の信号であるか、またはポリメラーゼが解離したDNA中の休止部位に起因するアーチファクトであるかを決定する時に困難を生じる。第三に、一つのバンドの強い信号はその隣の弱い信号を覆うであろうため、非常に近いバンドの間のDNA配列決定の正確さが減少する。TaborおよびRicharsonの上記の文献を参照された。

【0014】バンド強度の変化は、ほとんどのDNAポリメラーゼの固有の性質に由来しうるのであろう。ほとんどのDNAポリメラーゼはDNA配列分析に使用される鎖停止ジデオキシヌクレオチドを判別（discriminate）する。T4 DNAポリメラーゼはDNAシーケンシングに利用できないほどddNTPを判別する。大腸菌DNAポリメラーゼI、Taq、およびVent DNAポリメラーゼもまたddNTPを強く判別する（各々、ddNTPの取り込みが対応するdNTPより千倍遅い）。TaborおよびRicharson（上記文献、両方ともここに引例として含まれている）は、T7 DNAポリメラーゼがこのスペクトラムの別の末端にあり、ddNTPを数倍しか判別しないことを示した。もしDNAポリメラーゼが全ての配列で同じ程度にddNTPを判別するなら、この問題は単純にdNTPに対するddNTPの比を変えることにより克服できる。そのような試みは大腸菌DNAポリメラーゼIおよびTaq DNAポリメラーゼでなされている。しかしながら、判別の程度は隣接するDNA配列により変化し、隣接する放射性断片の強度に大きな変異をもたらす。特定の断片の強度は大腸菌DNAポリメラーゼIでは50倍変化し得るが、T7 DNAポリメラーゼではたった数倍である。その結果、T7 DNAポリメラーゼにより生成されたDNAシーケンシングゲル上のバンド強度は類似の強度であり、このことにより自動化法によるその検出および分析を容易にしている。さらに、ジデオキシヌクレオチドをデオキシヌクレオチドと同等に取り込むようにT7 DNAポリメラーゼによるジデオキシヌクレオチドに対する判別をさらに減らす方法が記載されている。これらの方法および条件は、クレーノーおよびTaq DNAポリメラーゼのような他のDNAポリメラーゼによる判別も減少させるが除去しない。例えば、反応混合物中のマグネシウムの代わりに、または、それに加えてマンガンを使用すると、ジデオキシヌクレオチドに対す

る判別を減少または除去するであろう。そのような条件下では、T7 DNAポリメラーゼは二つの分子を区別しないが、クレノー断片、Taq、およびVentのような他のDNAポリメラーゼはある程度区別する。例えば、クレノーはマンガン存在下でもddNTPを4倍も判別する。さらに重要なことは、クレノーおよびTaq DNAポリメラーゼのような酵素による判別の全体の程度が減少されても、特定の断片の強度はDNA中のある種の配列における高い判別により4倍以上変わり得る。これらのポリメラーゼおよび方法は現在、手動DNAシーケンシング（すなわち、上記のようなシーケンシング機を用いない）においてほとんど例外なく、および自動化法で広く使用されている。マンガンの使用およびすべての部位でのddNTPに対する判別の欠如により均一の強度のバンドが生じ、手動または自動化法によるシーケンスゲルの読みとりが容易になる。さらに、判別性の欠如は配列分析の新規の方法（Tabor およびRichardson、前記文献）の使用を可能とする。この発見に基づく方法が提供され、異なる比で四つすべてのddNTPを含む単一の反応を行い、ゲル電気泳動後各々の相対強度を測定することによりDNA配列が決定される。次のことが示されている：本発明のDNAポリメラーゼは、ジデオキシヌクレオチド類似体と正常なヌクレオチドとを有意に判別しない。すなわち、類似体を取り込まれる確率は正常なヌクレオチドが取り込まれる確率とほぼ同じであるか、または類似体は少なくとも正常なものの少なくとも1/10の効率で取り込まれる。本発明のポリメラーゼはまたその他の類似体も有意に判別しない。4つの正常なデオキシヌクレオシド三リン酸（dGTP、dATP、dTTPおよびdCTP）に加え、シーケンシング反応は他の型のヌクレオチド誘導体（通常³⁵S、³²Pまたはその他の化学試薬により合成鎖を標識するための放射性または蛍光標識ヌクレオシド三リン酸のような；）の取り込みを必要とするため、前記のことは重要である。DNAポリメラーゼが類似体を判別しない場合、類似体の取り込みの確率は通常のヌクレオチドと同じであろう。標識ヌクレオシド三リン酸については、合成DNA鎖を最少の放射活性を用いて効率的に標識するためにこのことは重要である [4, 942, 130, COL 5: 5]。

【0015】また以下のことも述べられている：シーケンス反応の結果をより簡単におよびより高い確度で読み取ることを可能にするため、ほとんど同じ強度の近接するバンドを生成する能力は有用である。さらに、特定の鎖停止剤を用いるシーケンス反応からのDNA生成物は近接するバンドとほとんど同じ強度を持つバンド群を形成するため、バンド強度それ自身がそのようにして形成された一連のバンドの特定の標識を与える。ある鎖停止剤により生成したほぼ同じ分子量のDNA生成物の数は、鎖停止剤の濃度に依存して変化する。したがっ

て、異なる濃度の各々四つの鎖停止剤を合成に用いると、一つの鎖停止剤を取り込んだDNA生成物は、その数または量が異なることにより他の鎖停止剤を取り込んだほぼ同じ分子量のDNA生成物から区別され；その結果、DNA生成物のバンドは単純にその強度を近接するバンドの強度と比較することにより鎖停止剤によるものと同定できる。その結果として、二つまたはそれ以上の一連のDNA生成物（各々、異なる鎖停止剤を含む）を単一のレーンでのゲル浸透に供し、各々のバンドの強度を近接するバンドの強度と比較することにより同定する、すなわち互いに区別することができる。さらに、異なる鎖停止剤を取り込んだDNA生成物の合成を別々に、すなわち別々の容器で実施する必要がなく、一つの反応容器中ですべて同時に実施でき、所望ならば各々に対する異なる標識の代わりに同一の標識（例えば、放射性同位元素、蛍光剤など）を全ての鎖停止剤について使用することができ、このことにより方法を単純化することができる [4, 962, 020, col 3:1-35]。

【0016】T7 DNAポリメラーゼまたは大腸菌DNAポリメラーゼによる触媒に対して、マグネシウムイオンをマンガンを置換することにより、ddNTPに対するこれらのポリメラーゼの判別を4-100倍減少させることを示しているTaborおよびRichardson *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4076-4080 (1989)、およびT7 DNAポリメラーゼを用いて均一の強度のジデオキシ停止断片を発生させるためのピロホスファターゼおよびマンガニイオンの使用を記載した、TaborおよびRichardson *J. Biol. Chem.* 265, 8322-8328 (1990)も参照されたい。

【0017】

【課題を解決するための手段】ジデオキシDNAシーケンシングのためのいくつかのDNAポリメラーゼの有用性の低さは、dNTPの代わりにddNTP（またはその他のヌクレオチド類似体）を取り込むこれらのポリメラーゼの能力が低いことに一部起因していると考えられる。上に示したごとく、判別しない能力は判別を行う酵素よりもより低い濃度のddNTPの使用を可能にし、最も重要なことは、その長さにしたがってより均一な強度のシーケンスゲル中のバンド形成パターンを提供することである。これらの結果は両方とも、酵素を用いる自動化シーケンシングをより容易にかつより有利にし、より長いDNA配列をより高い確信をもって決定することができる。

【0018】本発明は、本来は判別を行うDNAポリメラーゼを、対応する天然に存在する酵素よりもddNTPに対してより判別しないように変換しうする方法を提供する。この方法はポリメラーゼの遺伝的修飾を含み、dNTPの類似体を取り込むようにポリメラーゼの能力を高める鍵となる位置におけるアミノ酸残基を提供する。DNAポリメラーゼの特定の領域内におけるアミノ酸の

変更が、これらのDNAポリメラーゼがジデオキシヌクレオチドを取り込む能力に劇的な影響を与えることが決定された；挿入された特定のアミノ酸残基がポリメラーゼがddNTPをより判別するかまたはより判別しなくなるかを決定する。より効率的にジデオキシヌクレオチドを取り込むようにDNAポリメラーゼを修飾すると、DNAシーケンシングでのそれらの有用性に驚くべき効果を与えることが決定された。そのように修飾されたDNAポリメラーゼはDNAの増幅（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応による）、インビトロ突然変異発生およびDNA断片の末端の充填などの他の一般的な分子生物学の方法にも有用であることが証明されるであろう。本技術とDNAポリメラーゼの3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を変化させる既知の知識（TaborおよびRichardson、上記文献、により記載されているようなT7 DNAポリメラーゼのような）を組み合わせ、およびシーケンシング反応におけるマンガンおよびピロホスファターゼの使用により、現在知られているものよりも著しく優れた酵素を生成することが可能であろう。

【0019】一つの特定の観点、すなわち、DNAシーケンシングにおいては、DNAシーケンシングに使用する条件下、50℃より上の温度（特に60℃、70℃さらには80℃より上の温度）においてヌクレオチドの重合を触媒する能力を有する好熱性酵素が本分野ではよく知られている。そのような酵素は一般にこれらの温度で増殖する生物体に存在する。しかしながら、これらの酵素の多くはジデオキシヌクレオチドの取り込み能力の制限等の制限を受けていると考えられる。以下に示す方法を用いてこれらの酵素を修飾することにより、今や当業者はいかなる所望の好熱性DNAポリメラーゼをも、ジデオキシヌクレオチドをより効率的に取り込むように修飾することができる。そのような酵素は、自動化機および手動でのシーケンシングの両方のDNAシーケンシング、特にサイクルシーケンシングとして知られている方法について現存する酵素よりも優れているであろう。サイクルシーケンシングにおいては、同一のテンプレートから多数回のDNA合成が実施され、各々のサイクル後に合成された鎖が熱変性により除去される；このことはシーケンシング反応においてはるかに少ない量のDNAテンプレートを使用することを可能にする。

【0020】比較的判別を行わない酵素であるT7 DNAポリメラーゼ中のアミノ酸残基526がこの性質を生み出していることを実験的に決定した。残基526の修飾によりT7 DNAポリメラーゼの判別する能力を大きく増加させることが可能であることを決定した。T7 DNAポリメラーゼとその他のDNAポリメラーゼとの間のアミノ酸相同性に基づいて、他のDNAポリメラーゼ中の相同的な部位における残基の変更が、ジデオキシヌクレオチドを判別するその能力に同様に影響を与

えることを決定した。そのような相同的部位の例は大腸菌DNAポリメラーゼIの残基762およびTaq DNAポリメラーゼの残基667である。これらの例の三つすべてにおいて、この部位の残基がフェニルアラニン（F）と異なること、例えば、T7 DNAポリメラーゼにおけるようにチロシン（Y）であることが重要であることが示された。驚くべきことに、この一つのアミノ酸残基の修飾が、一つのヒドロキシル基の付加によるものであっても、判別の程度に非常に大きな変化（250 - 8000倍）をもたらす。当業者はこの一つの部位の変化に本発明が制限されないことを認識するであろうし、今やポリメラーゼの判別を行う能力を減少させる他の部位の変化も日常的な実験で容易に発見できるであろう。例えば、T7 DNAポリメラーゼの13個の別の部位における修飾もまたddNTPを判別する酵素の能力を増加させることを出願者は見込んでいるが、ただしこれらの部位での変更の影響ははるかに少なく、たった5 - 20倍である。類似の方法を用いて、他のDNAポリメラーゼにおいてddNTPの判別に影響を及ぼす他の部位を容易に同定することができ、それらをDNAシーケンシングでの使用により有用にすることができる。そのような他の部位として、大腸菌DNAポリメラーゼIおよびT7 DNAポリメラーゼ間で非常に相同している領域のアミノ酸残基が挙げられるが、これはこれらの領域はddNTPに対する結合領域の一部であるらしいためである；大腸菌DNAポリメラーゼIにおいてはこれらの領域として、領域665 - 681および754 - 783、および可能性のあるのは領域709 - 734、797 - 866および913 - 927の中の保存または非保存アミノ酸からの、T7 DNAポリメラーゼ内の領域に類似の領域内のアミノ酸が含まれる。所望の機能を与えるアミノ酸の変更はT7 DNAポリメラーゼのような非判別性酵素のアミノ酸、または日常的な実験により選択できる他の機能的に等価なアミノ酸の対応するアミノ酸と同一となるように選択できる。非保存アミノ酸を変化させることにより、判別する能力のより意味深い変更が得られる。非保存アミノ酸はポリメラーゼの一つの種と他の種で異なるアミノ酸であり、すなわち、ポリメラーゼの50%未満でしか観察されない。術語“類似”は、通常認められている様式で使用されている。従って、Pol I ポリメラーゼの類似体とはBraithwaiteおよびIto（後記）により記載されているようなアミノ酸配列を有するものであり、好適にはSpol DNAポリメラーゼのようにその中に記載されているポリメラーゼのPol I ファミリーの他のメンバーに関連するものである。そのような分析はFelsensteinのPHYLIPプログラムIdを用いて実行される。

【0021】従って、本発明の第一の観点は、修飾されたDNAポリメラーゼをコードしている修飾された遺伝子の特徴とする。この遺伝子は、対応する天然に存在す

るまたは非修飾DNAポリメラーゼと比較して、デオキシヌクレオチドと比較してジデオキシヌクレオチドを取り込む能力が増強された修飾DNAポリメラーゼを生成するように修飾されている。

【0022】”増強された能力”とは、DNAポリメラーゼがジデオキシヌクレオチドをより取り込むことができることを意味している。すなわち、それはデオキシヌクレオチドと比較してジデオキシヌクレオチドに対し、対応する天然に存在するDNAポリメラーゼよりもより少ない程度でしか判別しない。そのような判別を測定するための特別の方法が以下に提供される。術語”増強された”はそのようなジデオキシヌクレオチドを取り込む能力が測定可能な相違を与えることを意味している。好適な態様においては、これは天然に存在する酵素と比較して少なくとも10%の増加であるが、ジデオキシヌクレオチドに対する判別のレベルが少なくとも1.0から100倍、好適には100-500倍減少していることが好ましい。そのような酵素の一つの例は大腸菌DNAポリメラーゼIであり、それは（ここに指摘されているように）デオキシヌクレオチドと比較してジデオキシヌクレオチドの取り込みを140-1100倍判別する。本発明の方法により、酵素を実際にdNTPよりもddNTPを好むように誘導化できる（たった一つまたは二つのアミノ酸の変更により）。すなわち、ジデオキシヌクレオチドを取り込むポリメラーゼの能力が平均で1000倍増強された。

【0023】句”対応する天然に存在するDNAポリメラーゼ”とは、本分野でよく知られているものであり天然に見いだされるポリメラーゼを意味しており、それは好適には実験室においてインビトロまたはインビボの両方の操作で変えられていないものである。同様に、対応する核酸とは天然に見いだされるDNAポリメラーゼをコードしている核酸である。これはそのようなポリメラーゼをコードしている修飾核酸の比較のためのベースラインとして単に使用される。従って、テルムスアクアチカス (Thermus aquaticus)（”Taq”とも名付けられている）のDNAポリメラーゼのためのベースラインは細菌テルムス アクアチカス (Thermus aquaticus)に存在するTaq DNAポリメラーゼを天然にコードしている核酸である。そのようなポリメラーゼ内で変更してジデオキシヌクレオチドの取り込みの能力を変えることができる少なくとも一つの部位が提供される。これらの部位は単なる例であり本発明を制限するものではない。これは、DNAポリメラーゼの能力のこの性質を有用に変えることができるという知識を身につけている当業者に、そのような酵素をこれらの特定の部位または他の等価な部位で変えるための方法論がここで提供されているからである。

【0024】ここに記載した本発明の実施態様において、DNAポリメラーゼの修飾は一つまたはそれ以上の

アミノ酸の置換により行われる。しかしながら、修飾は一つまたはそれ以上のアミノ酸の挿入または一つまたはそれ以上のアミノ酸の欠失の形をとってもよいことが見いだされるであろう。

【0025】本発明のDNAポリメラーゼはまた、Tabo rおよびRichardson（上記文献）により記載されているような3'-5'エキソヌクレアーゼ活性またはBarnsにより（WO 92/06188）に記載されているようなTaq中の5'-3'エキソヌクレアーゼ活性のようなエキソヌクレアーゼ領域を除去または変更するように修飾してもよい。本発明のDNAポリメラーゼのddNTPを判別する能力を変える突然変異は、好適には実質的にエキソヌクレアーゼ活性に影響しない；このことは、突然変異は酵素のポリメラーゼ領域内の、重合化の活性部位近くにおいて生じ、単に取り込まれた類似体をそのエキソヌクレアーゼ活性を介して除去するポリメラーゼの能力を減少させることによる判別の減少ではない。本発明の特に好適なDNAポリメラーゼは、BraithwaiteおよびIto（21 Nuc. Acid. Res. 787, 1993、ここに引例として含まれている、およびファミリーAと称されている）により記載されているようなPol I型ポリメラーゼ、およびBraithwaiteおよびItoにより記載されており、ファミリーBと称されるようなポリメラーゼ アルファまたはポリメラーゼII型DNAポリメラーゼである。BraithwaiteおよびItoにより記載されている他のポリメラーゼファミリーもまた本発明で使用するができる。特に、dNTP基質の結合部位近くの位置の極性、ヒドロキシ含有アミノ酸残基の存在が、効率的にジデオキシヌクレオチドを取り込むことができるポリメラーゼに重要であることが見いだされた。理論に拘束されるわけではないが、リボース部分の3'位にヒドロキシル基のないヌクレオチド（すなわちddNTP）の高い判別には、同時にこの重要部位のアミノ酸残基上にヒドロキシル基がないことを必要とするという、予期された結果と逆であると考えている。別の言い方をすれば、両方のヒドロキシル基の不在により作り出された隙間または穴の存在により類似体の判別がもたらされる。この結果を考えると、関係が薄いDNAポリメラーゼにおいてさえも重要な残基を発見する方法が提供される；dNTPが結合する領域において極性基を持つ残基を非極性基に付加することは、ddNTPを判別するポリメラーゼの能力を減少させるための有用なアミノ酸変更の候補である。例えば、ラットDNAポリメラーゼb（ファミリーAまたはBと、たとえあるにしてもわずかな相同性しか持たないDNAポリメラーゼ）の272位のフェニルアラニンは、X線解析研究によりプライマーテンプレートとの三成複合体中でddCTPの3'位と接触していることが示されている（Pelletier et al., 264 Science 189, 1994）。本発明で説明された結果の知識は、ジデオキシヌクレオチドをより効率的に取り込むラットDNA

ポリメラーゼbの突然変異体のスクリーニングにおいてこの残基をチロシンに修飾することを論理的な選択にしている。したがって、当業者はここに提供された情報を用いて任意のDNAポリメラーゼの判別性の表現型を変えることができるであろう。

【0026】ジデオキシヌクレオチドをより効率よく取り込む本発明のいくつかのポリメラーゼの能力は特異的であろう(すなわち、ジデオキシヌクレオチド類似体に対する影響は他の類似体に対するよりもはるかに大きい)。しかしながら、ポリメラーゼのいくつかは他の塩基修飾類似体(例えば、電気泳動間のバンドの圧縮を除くためのデオキシイノシン三リン酸(dITP)および2'-デオキシ-7-デアザグアノシン 5'-三リン酸(dc'GTP)および自動化法に使用するための蛍光標識ジデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチド)の取り込みを助けるためにも有用である。さらに、そのようなポリメラーゼはリボヌクレオチドをより効率的に取り込むことができ、このことによりプロモーターを必要としないRNA合成を可能にすることができる。特に、T7 RNAポリメラーゼおよびファミリーAのDNAポリメラーゼ(Pol I型DNAポリメラーゼ)のような単一サブユニットDNA-依存RNAポリメラーゼ間の保存モチーフは、この領域(大腸菌DNAポリメラーゼIの残基758から767)における突然変異はrNTPに対する特異性を変化させるであろうことを示唆している。このことはRNA合成のためのプロモーターを必要とせずにプライマーからの合成を効率的に開始するRNAポリメラーゼを遺伝子工学で作ることを可能にする。同様に、ここで提供されるデータは、T7 RNAポリメラーゼの残基631-640の修飾はdNTPに対するその特異性を変化させるであろうことを示唆している。このことはプロモーター配列からの新規DNA合成を開始し、プライマーを使用できない新規のDNAポリメラーゼの遺伝子工学を可能にする。

【0027】好適な実施態様においては、修飾されたDNAポリメラーゼは、DNAポリメラーゼ活性に必要な宿主因子と組み合わせた場合、DNAシークエンシングに使用するために十分なDNAポリメラーゼ活性(例えば、少なくとも標準的なシークエンシング反応に使用されるほど;および好適には本分野で定義されているように少なくとも100単位/mg酵素;好適にはポリメラーゼ中の突然変異は以前のレベルを5-10倍より多く変化させない)を有しており;かつポリメラーゼのDNAシークエンシングでの使用を可能にする十分に低いエキソヌクレアーゼ活性(例えば500単位/mg未満、TaborおよびRichardson、上記文献を参照)を有しており;DNAポリメラーゼはT7型DNAポリメラーゼ(例えば、T7、T3、ΦI、ΦII H、W31、gh-1、Y、A1122およびSP6からなる群より選択されるもの)のジデオキシヌクレオチド結合部位の一つ

またはそれ以上のアミノ酸を有している。好適には、修飾DNAポリメラーゼは、テルムス アクアチカス (*Thermus aquaticus*)、テルムス テルモフィラス (*Thermus thermophilus*)、テルムス フラバス (*Thermus flavus*)、バシラス ステロテルモフィラス (*Bacillus sterothermophilus*) およびVent細菌によりコードされるDNAポリメラーゼ等の熱安定性酵素から修飾され;ジデオキシヌクレオチドを取り込むポリメラーゼの能力は、例えばただ一つのアミノ酸の変化により、対応する天然に存在するDNAポリメラーゼと比較して少なくとも10倍、50倍または最も好適には少なくとも100倍増加している。

【0028】第二の観点においては、本発明は、対応する天然に存在するDNAポリメラーゼの能力と比較してジデオキシヌクレオチドを取り込む増強された能力を有する修飾DNAポリメラーゼを生成する方法を特徴としている。本方法は、DNAポリメラーゼをコードしている核酸分子を用意し、核酸によりコードされているポリメラーゼのジデオキシヌクレオチドを取り込む能力を著しく(すなわち、少なくとも10倍、50倍または最も好適には100-150倍)変化させるヌクレオチド塩基配列内の一つまたはそれ以上の部位における一つまたはそれ以上の塩基を変更させるように核酸分子のヌクレオチド塩基配列に突然変異を起こさせ、または変化させることを含む。

【0029】第三の観点においては、本発明は、DNA分子のヌクレオチド塩基配列を決定する方法を特徴としている。本方法は、DNA分子にハイブリダイスしうるプライマー分子とアニールされたDNA分子を用意し;そしてアニールされた分子を少なくとも一つのデオキシヌクレオチド三リン酸、天然に存在するポリメラーゼと比較してジデオキシヌクレオチドを取り込む増強された能力を持つように天然に存在するDNAポリメラーゼを修飾したDNAポリメラーゼを含む容器内でインキュベートすることを含む。ポリメラーゼは十分なDNAポリメラーゼ活性およびDNAシークエンシングに有用である十分に低いエキソヌクレアーゼ活性を有する。特定のヌクレオチド塩基でDNA合成を停止させる少なくとも一つのDNA合成停止剤もまた提供される。本方法はさらに、インキュベートした反応物のDNA生成物を大きさに従って分離し、このことによりDNA分子の少なくとも一部のヌクレオチド塩基配列を決定しうることを含む。

【0030】好適な実施態様においては、DNAポリメラーゼは熱安定性DNAポリメラーゼであり、シークエンシングは50℃、60℃または70℃以上で実施され、かつDNAポリメラーゼはテルムス アクアチカス (*Thermus aquaticus*)、テルムス テルモフィラス (*Thermus thermophilus*)、テルムス フラバス (*Thermus flavus*)、バシラス ステロテルモフィラス (*Bacillus*

s. sterothermophilus)、*テルモコッカス リトラリス* (*Thermococcus litoralis*) (Vent)、*ピロコッカス フリオサス* (*Pyrococcus furiosus*) (Pfu) または *スルホバソルファタリカス* (*Sulfolobus solfataricus*) によりコードされているDNAポリメラーゼから誘導されたもの、すなわちアミノ酸残基に少なくとも50%の同一性を有するものである。

【0031】別の好適な実施態様においては、DNAポリメラーゼは、ポリメラーゼ1mg当たり1000、250、100、50、10またはさらに2単位未満のエキシヌクレアーゼ活性を有し、かつたった4、6または10塩基を有するプライマーを利用することができ；かつインキュベーション工程の開始時の四つすべてのデオキシヌクレオチド三リン酸の濃度は停止剤（例えば、ddNTP）により停止されるまでDNA合成の継続を可能とするのに十分なものである。

【0032】サイクルシーケンシングについては、本発明のポリメラーゼは今や他の酵素に比較して著しく少ない量のジデオキシヌクレオチドの使用を可能とする。すなわち、この方法は、サイクルシーケンシング反応において四つすべてのジデオキシヌクレオチドに対し過剰量のデオキシヌクレオチドを用意し、そしてサイクルシーケンシング反応を実施することを含む。他の酵素については、そのような反応に少なくとも一つの過剰のddNTPを加える必要があった。例えば、Sears et al., 13 *BioTechniques* 626, 1992、はVentポリメラーゼについてddNTPに対し約10倍過剰のddNTPの使用を記載しており、およびCarothers et al., 7 *BioTechniques* 494, 1989、はTaqポリメラーゼに対しddNTPの少なくとも2倍過剰のddNTPの使用を記載している。本発明においては、そのような過剰量の使用は必要とされない。好適には、対応するddNTPに対して2、5またはさらには10倍以上過剰のddNTPが提供される。特別の例においては、本発明の修飾Taqについて10μM未満のddNTPが使用される。

【0033】関連する観点においては、本発明は、上記の修飾DNAポリメラーゼおよびdITP、デアザGTP、ddNTPのような鎖停止剤およびマンガン含有溶液または粉末からなる群より選択されるシーケンシングに必要な試薬を含むDNAシーケンシングのためのキットまたは溶液を特徴としている。

【0034】別の観点においては、本発明は、修飾DNAポリメラーゼをコードする核酸配列を用意し、宿主細胞内でその核酸を発現させ、そして宿主細胞からDNAポリメラーゼを精製することによる、天然に存在するDNAポリメラーゼと比較してジデオキシヌクレオチドを取り込む高められた能力を有する修飾DNAポリメラーゼを提供する方法を特徴としている。

【0035】別の関連する観点においては、本発明は、一つまたはそれ以上（好適には2、3または4）のデオ

キシリボヌクレオシド三リン酸、上記のDNAポリメラーゼおよび第一の鎖停止剤を用いる、本質的に上に記載したようなDNA鎖のシーケンシングのための方法を特徴としている。DNAポリメラーゼはプライマーを伸長させて、伸長したプライマーの長さが異なる第一のDNA生成物の第一のシリーズを形成させ、各々の第一のDNA生成物はその伸長された末端に鎖停止剤を有し、および各々の第一のDNA生成物の分子の数は長さが20塩基未満しか異ならない実質的にすべてのDNA生成物についてほとんど同じである。本方法はまた、ハイブダイズした混合物中に第一の鎖停止剤と異なる濃度の第二の鎖停止剤を提供することを特徴としており、ここではDNAポリメラーゼは伸長されたプライマーの長さが異なる第二のDNA生成物の第二のシリーズを生成し、各々の第二のDNA生成物はその伸長末端に第二の鎖停止剤を有する。各々の第二のDNA生成物の分子の数は、長さが互いに1から20塩基しか異ならない実質的にすべての第二のDNA生成物についてほとんど同じであり、および該第二のDNA生成物と20塩基未満の長さの違いを有するすべての第一のDNA生成物の分子の数は明らかに相違する。

【0036】好適な実施態様においては、TaborおよびRichardson（上記文献）により記載されているように、異なる生成物の作製に三つまたは四つのそのような鎖停止剤を使用することができ、シーケンシング反応はマグネシウムイオンまたはマンガンまたは鉄イオン（0.05および100mMの間、好適には1および10mMの間での濃度で）と行われ；およびDNA生成物は四つ未満のレーンのゲルで分子量に従って分離される。

【0037】別の関連する観点においては、本発明は、オリゴヌクレオチドプライマー、シーケンスされるべき核酸、1および4の間のデオキシリボヌクレオシド三リン酸、上に記載したようなポリメラーゼおよび異なる量の少なくとも二つの鎖停止剤を、オリゴヌクレオチドプライマーが伸長してシーケンスされるべき核酸に相補的な核酸断片を形成するのに好ましい条件下に混合することによる核酸のシーケンス法を特徴としている。本方法はさらに、大きさにより核酸断片を分離し、核酸配列を決定することを含む。試薬はプライマー伸長生成物中の標識の強度により互いに異なる。

【0038】DNAシーケンシング反応のDNA生成物を分離するためにゲル電気泳動を使用することが一般的であるが、当業者は他の方法もまた使用しうることを認めるであろう。従って、飛行時間型質量分析、電子顕微鏡法および単一分子検出法のような方法を用いて異なる断片の各々を検出することが可能である。

【0039】本発明はまた、一つのプライマーおよびDNA鎖から形成される少なくとも二つのシリーズのDNA生成物を提供する試薬を含む反応器を有する自動化DNAシーケンシング装置を特徴としている。シリーズ

の各々のDNA生成物は分子量が異なり、一つの末端に鎖停止剤を有する。試薬は上に記載したようなDNAポリメラーゼを含む。本装置は、分離装置の一つの軸に沿ってDNA生成物を分離し、一連のバンドを形成させるための分離手段を含む。これはまた、軸に沿って分離した後各々のバンドの位置および強度を決定するためのバンド読みとり手段、および分離手段中に存在しているであろう標識からの光放出の波長からではなく軸に沿ったバンドの位置および強度のみからDNA鎖のDNA配列を決定するコンピューター手段を含む。

【0040】別の観点においては、本発明は以下のことを特徴としている：(a) クローン化断片および上に記載したDNAポリメラーゼを提供し、断片からDNA鎖を合成するための条件下にクローン化断片とポリメラーゼを接触させることによる、クローン化DNA断片のインビトロ突然変異発生方法。この条件は、断片と塩基対を形成しうる個々の連続する複数の塩基を取り込み、かつ断片と塩基対を形成できないヌクレオチド塩基を取り込むことによりDNA鎖を形成する。(b) プライマーおよびテンプレートを提供することによるテンプレートDNA断片のインビトロ突然変異発生法；このプライマーはテンプレートの連続する塩基と塩基対を形成しうる連続する塩基を有するが、ただし少なくとも一つの塩基はテンプレートと塩基対を形成することができない。本方法は、上記のようなDNAポリメラーゼによりプライマーを伸長させることを含む。(c) 一本鎖領域の5'末端を有する線状DNA分子から平滑末端二本鎖DNAを生成する方法。分子の3'末端は二本鎖であり、3'突出末端を有していない。本方法は、DNA分子を一本鎖領域に作用して平滑末端二本鎖DNA分子を生成する上記のDNAポリメラーゼとともにインキュベートすることを含む。(d) DNA断片の3'末端がポリメラーゼにより伸長され、このことによりDNA断片への標識デオキシヌクレオチドの付加により標識される条件下に、DNA断片を上記のDNAポリメラーゼおよび標識されたデオキシヌクレオチド種とともにインキュベートすることによるDNA断片の3'末端の標識法。(e) 第一および第二のプライマーを二本鎖DNA配列の反対側の鎖にアニールし、アニールされた混合物を上記のDNAポリメラーゼとともにインキュベートすることによるDNA配列の増幅法。第一および第二のプライマーは、アニール後3'末端が互いに向き合ってDNA配列の反対側の鎖にアニールしており、増幅されるべきDNA配列は二つのアニールされたプライマーの間に位置している。

【0041】さらに別の観点においては、本発明は残基667にチロシンを有するテルムスアグアチカス (*Thermus aquaticus*) DNAポリメラーゼ、残基762にチロシンを有する大腸菌DNAポリメラーゼI、および大腸菌DNAポリメラーゼ残基762と類似の位置、例え

ば、アミノ酸配列KN₁N₂N₃N₄N₅N₆N₇YG (式中各々のNは独立して任意のアミノ酸である)のN₁位にチロシン残基を持つP₀1 I型DNAポリメラーゼ()のような特定のDNAポリメラーゼを特徴としている。さらに、本発明は、配列KN₁N₂N₃N₄N₅N₆YG/Q (式中各々のNは独立して任意のアミノ酸である)を有し、残基N₁からN₇の一つはddNTPの判別性が減少されている(好適には非突然変異配列に比較して少なくとも20倍減少されている)ポリメラーゼを産生するように突然変異を起こされているDNAポリメラーゼアルファファミリーの特定のポリメラーゼを特徴としている。本発明はまたこれらのDNAポリメラーゼをコードする核酸も特徴としている。

【0042】関連する観点においては、本発明は、唯一の添加二価のカチオンとしてのマグネシウムの存在下に、100未満の平均連続移動性(processivity)を有し、dNTPと比較してddNTPの取り込みの判別が100倍未満であり、または唯一の添加二価のカチオンとしてのマグネシウムの存在下に、50未満の平均連続移動性を持ち、dNTPと比較してddNTP取り込みの判別が50または5倍未満である、逆転写酵素を除くDNAポリメラーゼを特徴としている。当業者は連続移動性が常法により測定でき、T7 DNAポリメラーゼの平均連続移動性は少なくとも500であり、クレノー断片は約4-40、および逆転写酵素は約150-200であることが示されることを認めるであろう。そのような測定はここに引用されるTabor et al., *J. Biol. Chem.* 262:16212, 1987に記載されているように実施できる。これらの条件下において、Taq DNAポリメラーゼの平均連続移動性は100未満であることが期待される。

【0043】特に好適な態様においては、本発明は、例えばマグネシウムの存在下に、dNTPと比較してddNTPに対する判別が100倍未満の好熱性DNAポリメラーゼを特徴としており、それは好適には100未満の平均連続移動性を有し、一つのプライマー-テンプレートから他のものへ、1または10秒に2回以上サイクルする。そのようなサイクルは常法により測定できる。

【0044】本発明はまた、上記のDNAポリメラーゼを用いるサイクルシーケンシングの方法を特徴とし、また、ポリメラーゼがdNTPと比較してddNTPを50倍以上判別しないようにさせる位置において天然に存在するアミノ酸の代わりにチロシンを有する細胞(ウイルスまたはミトコンドリアに対するものとして)DNAポリメラーゼも特徴としている。

【0045】別の態様では、示された部位でのアミノ酸の置換が対応する天然のポリメラーゼのその他の性質の変化を生じさせるであろう。さらに、本発明のポリメラーゼはここに記載した方法で他のポリメラーゼと組み合わせ用いてもよく、混合物中で各々のポリメラーゼの

優れた性質が利用される。

【0046】本発明の他の特色および利点は以下のその好適な実施態様および請求の範囲の記述から明らかになるであろう。

【0047】

【発明の実施の形態】

ジデオキシ抵抗性突然変異体

以下はいくぶん関連がある報文に関する簡単な議論である。係争中の請求の範囲への従来の技術を許容するものではなく、本発明の理解を助けるために提供されている。

【0048】Reha-Krantz et al., バクテリオファージ T4 DNAポリメラーゼの突然変異的分析, "DNA合成の忠実度: 構造および機構的前途" と題されたミーティング, Beaufort, North Carolina, 1989年11月24-29日で発表されたポスター発表の抄録から、はC末端突然変異体ではddNTPの利用が増加したことを記載している。しかしながら、Reha-Krantz et al., *J. Virol.* 67, 60-66 (1993)は野生型T4 DNAポリメラーゼと比較して突然変異体L412MはddGTPに対するKiは50倍低かったが、T4 DNAポリメラーゼの突然変異体および野生型の間にddGTPの取り込み効率には変化は観察されなかったことを示している。63ページに、"ddGTPへのL412M DNAポリメラーゼの感度にもかかわらず、野生型およびL412M DNAポリメラーゼによるddNTPの取り込みには相違は観察されなかった"と述べている。また、"単一の領域がPPiまたはヌクレオチドのただ一つの結合部位かどうか明かではない"とも述べている。さらに、Reha-KrantzおよびNonay, *J. Biol. Chem.* 268, 5635-5643 (1994)は突然変異体L412Mおよびその他の突然変異体T4 DNAポリメラーゼの研究を報告している。

【0049】Gibbs et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 85, 6672-6676 (1988)およびLarder et al., *the EMBO Journal* 6, 169-175 (1987)は多数のヌクレオチド類似体への抵抗性で選択された場合、ヘルペスDNAポリメラーゼで得られた突然変異のスペクトルについて記載している: ピロホスフェート、ホスホノ酢酸およびホスホノギ酸、アシクロビル、ピダラビン、ガンシクロビルおよびプロモビニルデオキシウリジン。一つの薬剤に抵抗する突然変異体の多くは他の薬剤(基質の異なる領域に対する類似体でも)にも抵抗することを示している。

【0050】Derse et al., *J. Biol. Chem.* 257, 10251-10260 (1982)はホスホノギ酸(ピロホスフェート阻害剤)存在下の増殖で選択されたヘルペス単純ウイルスDNAポリメラーゼの5つの組の突然変異体について記載している。各々の組の突然変異体についてddGTPに対する抵抗性が比較された(ページ10256、表II I)。すべてddGTPに対するKiが20から100倍増加していた。

【0051】Prasad et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 11363-11367 (1991)は直接スクリーニング戦略を用い、HIV逆転写酵素内の単一の突然変異(Glu 89からグリシンへの変化)がポリメラーゼをddGTPに対してより抵抗性に行っていることを示した(同じ程度の阻害を得るには約10倍のddGTPを必要にした)。この突然変異はホスホノギ酸(ピロホスフェート類似体)を含む多くの類似体に対し広範な抵抗性を与えた。突然変異体はddTTP、ddCTPおよびddGTPには等しく抵抗したが、ddATPへの抵抗は弱かった。

【0052】Song et al., *J. Virol.* 66, 7568-7571 (1992)はヒト免疫不全ウイルスタイプI逆転写酵素のglu-89を9つの異なるアミノ酸残基に突然変異させ、ddGTPおよびホスホノギ酸(ピロホスフェート類似体)に対する各々の突然変異体酵素の抵抗性を測定した。突然変異は2つの組に分類された; Glu-89のアラニン、グリシン、バリンまたはスレオニンへの置換は野生型酵素に比較してddGTPおよびホスホノギ酸の両方に抵抗性が高い酵素を生じ、一方セリン、グルタミン、アスパラギン、アスパラギン酸およびリジンへの突然変異はddGTPに対して中程度のまたは抵抗性がない酵素を生じた。どの突然変異も野生型酵素よりddGTPに対し抵抗性が小さい酵素は生じさせなかった(表I、ページ7569)。筆者らは彼らの結果および逆転写酵素の結晶構造から、逆転写酵素の89番目および90番目の残基がdNTP結合ポケットの部分を形成していると推測している。

【0053】ddNTP選択性を生じる突然変異の近くの突然変異による大腸菌DNAポリメラーゼI突然変異体蛋白質の性質に関する報文は以下のものである: Carroll et al., *Biochemistry* 30, 804-813 (1991)は2つの突然変異体(Tyr 766 SerおよびTyr 766 Phe)の普通のデオキシヌクレオチドに対する誤取り込みを研究した。Polesky et al., *J. Biol. Chem.* 265, 14579-14591 (1990)は2つの異なる性質を持つ突然変異を特徴付けた: (1) チロシン766、アルギニン841、およびアスパラギン845; 著者らはこれらの残基は入ってくるdNTPと接触することを示唆している。(2) グルタミン849、アルギニン668およびアスパラギン酸882; 著者らはこれらの残基は触媒に含まれていることを示唆している。Polesky et al., *J. Biol. Chem.* 267:8417 (1992)、はアルギニン668、グルタミン849およびアスパラギン酸882およびさらにアスパラギン酸705およびグルタミン酸710での突然変異を特徴付けている。この研究において、著者らはアルファーチオ置換dNTP(すなわち、リン酸部分での類似体)の取り込みを見ている。Pandey et al., *J. Biol. Chem.* 269, 13259-13265 (1994)は大腸菌DNAポリメラーゼIのリジン758をアラニンおよびアル

ギニンに変化させた二つの突然変異体に注目した。著者らはBasu et al., *Biochemistry* 26, 1704-1709(1987)が同じリジン758がdNTPの結合に関係していることを示していることを指摘している。このことが化学的に示された; DNAポリメラーゼIがヌクレオチド類似体、ピリドキサル 5'-リン酸を用いて共有結合で修飾され、リジン758が修飾されるべき残基であるといわれている。

【0054】Beese et al., *Biochemistry* 32:14095-14101(1993)はdNTPまたはピロホスフェートと複合体を形成したDNAポリメラーゼIのクレノー断片の共結晶の構造について記載している。著者はdNTPはヘリックスOに隣接して結合していると述べている。著者らは以下の報告をしている: (a) "Mg-dCTP複合体において、シトシンがHis881と相互作用し、一方、糖はPhe764 [sic., 762] と相互作用している(図3および5)。" (b) "しかしながら、二成分複合体中のdNTPの少なくともdNMP部分の位置は、プライマーテンプレートDNAとの触媒的に関連した複合体の位置とは同じではないらしいと結論された。" (c) "dNTPの塩基のための全結合部位はテンプレート鎖へのワトソン-クリック水素結合およびプライマー鎖の3' 塩基上のそのスタッキングにより形成されるので、二成分複合体中の塩基のための結合部位が完全に偶然ということはあるそうもなく、条件に依存していくつかの位置に結合できるという我々の観察と一致している。" (d) "二成分複合体の結晶で観察されたdNTPの結合部位は、溶液の研究で観察されたものと同じである。しかしながら、この二成分複合体からプライマーおよびテンプレートDNA存在下でのdNTPとの複合体モデルへの外挿には十分な注意が必要である。dNTPの糖および塩基部分は正しいコンホメーションで結合されたプライマー-テンプレートDNAを必要とする。

【0055】JoyceおよびSteitz, 63 *Ann. Rev. Bioc.* 777, 1994 (本発明に対する従来の技術であるとは認められていない) は種々のDNAおよびRNAポリメラーゼの関係を議論している。DNAポリメラーゼの"パーム" ("フィンガー" よりも) サブドメインの3つの機能を示している一すなわち、触媒中心プライマーの3' 末端の結合部位およびdNTP結合部位。HIV-1逆転写酵素においてDNAポリメラーゼ阻害剤の結合に影響する突然変異は残基67-70付近であることが示されている。" また糖のヌクレオチド塩基の位置からは何等有用な結論導き出せないが、クレノー断片およびdNTPリン酸基間の接触の同定において結晶性二成分複合体からの情報が役に立つであろう" と述べられている。前のパラグラフにおいて" ポリメラーゼ-dNTP二成分複合体を形成できるが、そのような複合体は触媒的には応答能がない" と述べられている。さらにデー

タ" Phe762の近くにデオキシリボースが配置されるであろう" および" モデルとして作られたテンプレート鎖に近接するフィンガードメインに位置しているTy r 766 (クレノー断片ヘリックスO内) の突然変異体はデオキシおよびジデオキシヌクレオチド基質間の判別に影響する. . ." ことが示されている。しかしながら、" クレノー断片において、三成分複合体中のdNTPの結合 (K_{app}) に反映される) に影響することが観察されている突然変異はフィンガーサブドメイン内または近くのポリメラーゼの裂け目の一側面に位置している。この様に同定された位置は遠くはヘリックスQのN末端 (Arg841およびAsn845)、ヘリックスOの露出した面 (Thr766、Phe762およびArg754) および触媒中心近くの近接する残基 (Asp705およびGlu710) を含む。動力学的方法の利点は三成分複合体が証明されることである; しかしながら、上に議論したごとく、他の構造的証拠なしにテンプレート相互作用により開始される直接の影響を区別するのは不可能である。さらに、前にリストした側鎖はdNTP分子より大きな領域を包含しており、それ故、全部はそれと直接接触されない。これらの研究により示されたクレノー断片の領域はテンプレート鎖と広い範囲の接触をしていると考えられたので、上に述べられた残基のサブセットはdNTPと直接接触しており、一方、残りはテンプレートDNAを結合しているというのが妥当な説明である。

【0056】Pelletier et al., 264 *Science* 1891, およびSawaya et al., 264 *Science* 1930, 1994 (本発明にたいする従来の技術であるとは認められていない) は反対に、Pol β のヘリックスM-N (クレノーのヘリックスJ-Kに類似している) 内の残基271-274が" 共通の機能、ヌクレオチド判別を行っている" ことを示している。

【0057】Sousa et al. 364 *Nature* 593, 1993 (本発明にたいする従来の技術であるとは認められていない) はT7 RNAポリメラーゼの3次元構造およびその大腸菌DNAポリメラーゼIとの相同性が記載されている。彼らの観察結果は" KF (クレノー断片) (b-鎖14 [残基916から928] およびC末端) のC末端要素は重合化の間dNTPのデオキシリボース部分と接触し、rNTPおよびdNTP基質を判別する" ことを示唆すると記載している。

【0058】ジデオキシチミジンのようなジデオキシヌクレオチドはT7ファージ増殖の強い阻害剤である。DNA合成の阻害はT7 DNA内へのジデオキシヌクレオチドの取り込みの結果であることが実験で示されている。ジデオキシヌクレオチドは非感染大腸菌には阻害を示さない。大腸菌DNA合成を阻害しないことへの説明はわからないが、細胞の取り込み、大腸菌DNAポリメラーゼIIIによるそれらの取り込みに対する高いレベル

の判別、三リン酸への不十分なリン酸化または効率のよい除去により説明できるであろう。どの場合においても T7 突然変異体ファージが生じることが観察され、寒天プレート上に約 10^3 の頻度でジデオキシヌクレオシドを含む正常なプラークを得ることができる。多くのこれらの突然変異の位置が図 1 に示されている。それらは遺伝子 5 蛋白質内に残っている。突然変異体遺伝子 5 蛋白質は天然の遺伝子 5 蛋白質よりも ddNTP をより強く判別する（数倍）。この組のいくつかは ddNTP のリボース部分の認識に重要なポリメラーゼの領域の輪郭をなしている。

【0059】ジデオキシヌクレオシドを用いるこの選択により得られた突然変異はリボース部分を認識する遺伝子 5 蛋白質の領域の変化に基づいていることに注目するのは重要なことである。しかしながら、そのような突然変異が他のヌクレオチド類似体に劇的な影響を持つであろうことは可能である。さらに、他の類似体存在下のファージの増殖に基づき、他のヌクレオチド類似体の強い判別を行う他の T7 突然変異体の選択に同一の方法を使用することも可能である。

表 I

T7 DNAポリメラーゼジデオキシ抵抗性突然変異体の要約

| 突然変異体 | 単離体 No. | 修飾 |
|-------|-------------------|---------------------------|
| DR1 | 1 | Ala 425 → Thr 疎水性 → 極性 |
| DR2 | 1 | Phe 434 → Ser 疎水性 → 極性 |
| | | Gly 442 → Ser 疎水性 → 極性 |
| DR3 | 1 | Val 443 → Ile 疎水性 → 疎水性 |
| DR4 | 2 | Arg 444 → His 強塩基 → 弱塩基 |
| DR5 | 1 | Arg 444 → Cys 強塩基 → 中性、極性 |
| DR6 | 8 | Ser 477 → Phe 極性 → 疎水性 |
| DR7 | 4 | Asp 504 → Asn 塩基性 → 中性 |
| DR8 | 2 | Ala 513 → Thr 疎水性 → 極性 |
| DR9 | 2 | Thr 517 → Ile 極性 → 疎水性 |
| DR10 | 1 | Ala 532 → Ser 疎水性 → 極性 |
| DR11 | 1 | Arg 566 → Cys 強塩基 → 中性、極性 |
| DR12 | 1 | Ala 619 → Thr 疎水性 → 極性 |
| DR13 | 3 | Ala 700 → Thr 疎水性 → 極性 |
| 要約 | | |
| 7 | 疎水性 → 極性 | |
| 3 | 強塩基 → 中性、極性または弱塩基 | |
| 2 | 極性 → 疎水性 | |
| 1 | 疎水性 → 疎水性 | |

インビトロ突然変異発生

T7 のクローン化遺伝子 5 のインビトロ突然変異発生が遺伝子 5 蛋白質の構成に使用され、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I の異なる領域が T7 遺伝子 5 蛋白質の類似または相同領域に置換された。上に議論したように、我々はヌクレオチド類似体を取り込むこれらの酵素の能力の決定および、これらの類似体に対する判別の程度に特に興味を持っている。図 2 を参照すると、T7 DNA ポリメ

* 【0060】表 I を参照すると、種々の DR 突然変異体が表示されており、アミノ酸の置換は表に記されている。アミノ酸置換の特徴は表の右側に示されている。これらの突然変異体の位置は T7 DNA ポリメラーゼのパームおよびフィンガー領域を通して図 1 に示されている。サム領域は可動性領域であり、生成物デュープレックス DNA のマイナーグループと相互作用する；パーム領域は活性中心、プライマーの 3' 末端の結合部位であり、ddNTP 結合に寄与する；フィンガー領域は合成部位に近い ss テンプレートと相互作用し ddNTP 結合に寄与する。これらの突然変異体は色々なポリメラーゼに渡って広く分散されており、すべてジデオキシヌクレオチドの取り込みに比較的小さな影響を示した（ジデオキシヌクレオチドの取り込み能力をただ 5-20 倍減少させた）。さらに、これらの突然変異体のいくつかは DNA ポリメラーゼ I に比較的非相同な領域に位置している。従って、これらからは ddNTP 判別に関与する他の Pol I 酵素内部の位置の指摘ができない。

【0061】

* 20 【表 1】

※ ラーゼおよび大腸菌 DNA ポリメラーゼ I の間のハイブリッドが形成される領域は、領域 A-E として印を付けて示されている。

【0062】図 3 を参照すると、領域 C がポリメラーゼの他の領域より著しく大きな効果を持っているリボ選択性領域を提供することが決定されている。これら他の領域のいくつかは特に図 3 に示されている。

※ 50 【0063】図 4-6 を参照すると、この領域のアミノ

酸の置換でポリメラーゼのリボ選択性を、大腸菌DNAポリメラーゼI型からT7 DNAポリメラーゼ型へおよび逆に変換することが可能なことが決定された。従って、P o l I型ポリメラーゼのこの領域を標的とした突然変異発生によりポリメラーゼのリボ選択性を著しく変えることができる。効果は少なくとも50-100倍であり、一般的には500倍以上である。

【0064】DNAポリメラーゼ

本発明に有用なDNAポリメラーゼにはT7型DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼIのラージフラグメントおよびT a qポリメラーゼを含む”P o l I型DNAポリメラーゼ”と称される相同的ポリメラーゼの組に属しているものが含まれる。

【0065】本発明に有用なDNAポリメラーゼにはT7型DNAポリメラーゼ(T7、T3、ΦI、ΦII、HW31、g h-1、Y、A1122またはSP6)を含む相同的ポリメラーゼの組に属しているものが含まれる。相同的ポリメラーゼとはDelarue et al., Protein Engineering 3, 461-467(1990)に記載されているような酵素を意味しており、それにDNAポリメラーゼのP o l Iファミリーが整頓され並べられている。それにはまたポリメラーゼの6つのファミリーからの保存配列モチーフが整列されている:P o l IからのDNAポリメラーゼ、P o l アルファおよびP o l ベータファミリー、DNA依存性RNAポリメラーゼ、逆転写酵素およびRNA依存性RNAポリメラーゼ;彼らの結果はすべてのポリメラーゼ間でいくつかの残基が保存されていることを示唆している。彼らの整列(図3、ページ463)に従うと、ここで同定された選択性残基(大腸菌DNAポリメラーゼIのフェニルアラニン762)は”モチーフB”にある。DNAポリメラーゼのP o l Iファミリーに加えて、モチーフBはDNAポリメラーゼのP o l アルファファミリーおよびDNA依存性RNAポリメラーゼのT7ファミリーに見いだされる;従ってこの整列は、T4 DNAポリメラーゼ、ヘルペスDNAポリメラーゼ、Φ29 DNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼおよびP f u DNAポリメラーゼを含むポリメラーゼの他のファミリーで突然変異させなければならない残基を強く示唆している。

【0066】さらに、Joyce, Current Opinion in Structural Biology 1, 123-129(1991)は多くのポリメラーゼからのDNA配列を比較し、少数の重要な活性部位残基が保存されていることを示唆している。特に、p o l Iファミリー(T7、p o l I、T a q)およびp o l アルファファミリー(T4、Φ29、ヘルペス)のポリメラーゼ間の類似性を議論している。図1(ページ124)でJoyceはこれらの2つのファミリー内の5つの不変異性残基の位置を示している;これらにはリジン758、チロシン766およびグリシン767が含まれている;これらはすべてここで同定された選択性残基(フェ

ニルアラニン762)の非常に近くに存在する。

【0067】これらのポリメラーゼは、シーケンシング反応のDNA生成物をゲル中で走らせた場合、好適にはほとんど均一の強度(約1.5から2.0倍の強度の変化)の近接するバンドを産生する条件下でのDNAシーケンシングで使用された。近接したとは、6000(すなわち20塩基)までの分子量の相違によるDNA生成物により示されるバンドを含むことを意味している。この強度の実際の値はTaborおよびRichardson(上記文献)に記載されているごとくゲルの長さに沿って減少するであろう。バンド強度はバンド内のDNA生成物の数を反映している。蛍光発生または放射性同位元素のような標識がそのようなDNA生成物の数を反映する強度の容易に検出可能なバンドの産生に使用された。従って、本発明において一つの鎖停止剤による一つのシーケンシング反応に由来する近接バンドはほとんど同じ数のDNA生成物を持ち、従って均一のパンド強度である。シーケンシング条件にはマンガン(IIおよびIII)、第一鉄および第二鉄イオンのような特定の二価または三価カチオンの存在下でのポリメラーゼのインキュベーションが含まれる;DNA合成に検出可能な影響を与えないまたは有害である一価および二価のカチオンにはK、Na、Ba、Be、Ca、Cc、Cr、Co、Cu、Ni、SiおよびZnが含まれる。アニオンは重要ではない、例えば、塩素、酢酸塩および硫酸塩が適している。これらの条件下、ジデオキシヌクレオシドのような鎖停止剤にたいする要求は本発明のための酵素で数倍減らされるであろう。利用可能な二価金属イオンの濃度の制御を助けるため、この溶液にキレート剤も加えられる。例えば、クエン酸塩またはイソクエン酸塩が加えられる。これらのキレートは例えば、広い範囲のマンガン濃度にわたり、遊離のマンガンイオンの濃度を10および100 μMの間に維持すると考えられている。すなわち、キレート剤は緩衝剤として働いている。

【0068】

【表2】大腸菌DNAポリメラーゼI、T7 DNAポリメラーゼ、およびT a q DNAポリメラーゼ間のヘリックスO内のドメイン交換のd d NTPに対する判別性への影響。3つのポリメラーゼの配列は最初の残基の番号とともに一番上に示されている。これら3つのポリメラーゼの保存配列の下にT7 DNAポリメラーゼ(T7)、大腸菌DNAポリメラーゼI(P o l I)およびT a q DNAポリメラーゼ(T a q)で特性付けられた突然変異体が表示されており、突然変異を起こした残基に下線が付けられている。各々の突然変異体は実施例2に記載したSDSゲル分析によるd d NMPとd NMPの取り込みの相対速度が試験され、右側に結果が示されている。突然変異体T7 C-T8、P o l I C-K6およびT a q C-Q5がさらなる分析のため野生型蛋白質とともに精製された。

【0069】

| 酵素 | 配列 | ddNTP判別 |
|------------|---------------------------|---------|
| Pol I 754 | RRSAKAINFG LIYG | 高い |
| Taq 658 | RRAAKTINFG VLYG | 高い |
| T7 517 | RDNAKTFIYGF LYG | 低い |
| Consensus | R AK G YG | |
| T7 WT | RDNAKTFIYGF LYG | 低い |
| T7 C-T2 | <u>RRSAKAINFG LIYG</u> | 高い |
| T7 C-T3 | <u>RRSAKTFIYGF LYG</u> | 低い |
| T7 C-T4 | RDNAK <u>A</u> INFG FLYG | 高い |
| T7 C-T5 | RDNAK <u>A</u> I IYGF LYG | 低い |
| T7 C-T6 | RDNAKT <u>F</u> NFG FLYG | 高い |
| T7 C-T2 | RDNAKT <u>F</u> NYGF LYG | 低い |
| T7 C-T3 | RDNAKT <u>F</u> IFGF LYG | 高い |
| Pol I WT | RRSAKAINFG LIYG | 高い |
| Pol I C-K1 | <u>R</u> DNAKTFIYGF LYG | 低い |
| Pol I C-K2 | RRSAK <u>T</u> FIYGL IYG | 低い |
| Pol I C-K3 | RRSAK <u>T</u> FNFG LIYG | 高い |
| Pol I C-K4 | RRSAKAI <u>I</u> YGL IYG | 低い |
| Pol I C-K5 | RRSAKAI <u>I</u> FG LIYG | 高い |
| Pol I C-K6 | RRSAKAIN <u>Y</u> GL IYG | 低い |
| Taq WT | RRAAKTINFG VLYG | 高い |
| Taq C-Q1 | <u>R</u> DNAKTINFG VLYG | 高い |
| Taq C-Q2 | RRAAK <u>T</u> FIYGF LYG | 低い |
| Taq C-Q3 | RRAAKT <u>I</u> IYGV LYG | 低い |
| Taq C-Q4 | RRAAKT <u>I</u> IFGV LYG | 高い |
| Taq C-Q5 | RRAAKTIN <u>Y</u> GV LYG | 低い |

特異性残基

↑

本発明のDNAポリメラーゼはDNAテンプレートの長さによるジデオキシヌクレオチド類似体およびデオキシヌクレオチド間を有意には判別しない。すなわち、これらのポリメラーゼは3' ヒドロキシル基を持つヌクレオチドに対しそれを持たないもの（すなわち、リボースの3' 位に2つの水素を持っている）を有意に判別しない。しかしながら、これらのポリメラーゼはマンガンまたは鉄の存在下においても、ヌクレオチドの他の位置の修飾を判別するであろう。例えば本ポリメラーゼはデオキシヌクレオチドと比べ、結合された蛍光基を持ついくつかのジデオキシヌクレオチド類似体を判別するであろう。しかしながら、本ポリメラーゼはジデオキシヌクレオチドへの修飾の存在または不在に基づいて、隣のまたは近接したヌクレオチドを異なる程度では判別しない。このように本ポリメラーゼはこれらの類似体を強く判別するが、非修飾ジデオキシヌクレオチドに比較してDNAシークエンシング反応にはより高い濃度を必要とせず、近接するバンドの強度は依然として均一であろう。

【0070】このように本発明のポリメラーゼは鎖停止剤の取り込みの均一な効率を提供する（全取り込みが異なっても）。さらに、本発明の他のポリメラーゼは対応する天然に存在する酵素よりも蛍光ddNTPでより均

* 一なバンドを与えるであろう（非標識または放射性標識ddNTPによるほど均一ではないが）。

【0071】本発明に有用な鎖停止剤には2', 3' ジデオキシ構造を持つジデオキシヌクレオチドが含まれる。本発明に有用な他の試薬は、特定の塩基でDNAシークエンシング反応を特異的に停止でき、および上記の条件下ポリメラーゼによる判別を受けないものである。

【0072】特定の鎖停止剤またはシークエンシング反応混合物の他の成分と組み合わせられたどの特定のDNAポリメラーゼが本発明に有用であるかを決定するために、TaborおよびRichardson（上記文献）に記載されているような標準的なシークエンシング反応が実施され、シークエンシングゲル中のバンド形成の広がりおよび近接バンドの均一性が調べられた。もしポリメラーゼ反応がプライマーを少なくとも20塩基伸長させなかったらば使用された条件には適していない。2倍またはそれ以下の範囲内の隣接するバンドの均一性は本発明で有用であり、好適には均一性とは1.0-1.5倍の範囲内である。同様に、最適なカチオン濃度または本発明に有用な他の潜在的なカチオンが種々の条件下でのこのシークエンシング反応の使用により決定された。例えば、カチオンが0.005-100mMの範囲で試験された。そ

のような実験の例は以下に記載されている：任意の一つの酵素についてdNTPと比較した対応するddNTPの取り込み能力は、決められた範囲でのDNA合成を停止させること（決められた分子量より小さなバンドの産生で検出された）を可能にするのに必要なddNTPとdNTPの比として測定された。すなわち、シーケンシングゲルの特定の範囲内で反応で産生されたバンドが終了する。このように、もし一つの酵素が他の酵素と比較して与えられたddNTPを1000倍以上判別するならば、ゲルの同一の範囲の対応する部位で終わるバンドを得るにはdNTPに対し1000倍以上の比のddNTPが必要であろう。

【0073】エキソヌクレアーゼ活性

本発明のDNAポリメラーゼは好適には50%未満、より好適には1%未満、および最も好適には0.1%未満の正常または天然に付随するレベルのエキソヌクレアーゼ活性を持っている（ポリメラーゼ分子当たりの活性の量）。正常または天然に付随するレベルとは例えば非修飾T7型ポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性を意味している。以下に記載したようなChase et al., (249 J. Biol. Chem., 4545, 1974)の方法の改良法により測定された、ポリメラーゼのmg当たりに通常付随する活性は約5000単位である。エキソヌクレアーゼはテンプレートに間違っただけ塩基対生成されている新しく合成された塩基を切り出すことによりDNA合成の忠実度を上げる。そのような付随エキソヌクレアーゼ活性はDNAシーケンシング反応の質に有害であろう。ヌクレオチド濃度が落ちた場合、ポリメラーゼ活性はエキソヌクレアーゼ活性と同じような速度まで遅くなり、その結果全体でのDNA合成がなくなるか、または合成されたDNAの分解さえ起こるので、付随エキソヌクレアーゼ活性はヌクレオチド前駆体の最小必要濃度を上げることになる。

【0074】より重要なことは、付随エキソヌクレアーゼ活性は二次構造妨害物を持つテンプレート中の領域でDNAポリメラーゼの空転を起こさせるであろう。ポリメラーゼがそのような構造に近づいた場合、その合成速度は通過しようとするほど遅くなる。ポリメラーゼが立ち往生した場合、付随エキソヌクレアーゼは新しく合成されたDNAを切り出すであろう。その結果、合成および切り出しの多数の循環を起こすであろう。このことにより、ポリメラーゼは結局ヘアピンを通過して合成し（シーケンシング反応の質には有害ではない）；またはポリメラーゼが合成鎖から解離するであろう（4つすべてのシーケンシング反応において同じ位置に人工のバンドを生じる）；または鎖停止剤が高頻度で取り込まれ、シーケンシングゲル中の異なる断片の強度に広範囲の変異が生じる。このことは与えられた部位での鎖停止剤の取り込みの頻度がポリメラーゼが鎖停止ヌクレオチドを取り込まなければならない機会の回数とともに増

加するために起こる。

【0075】理想的なシーケンシング反応はゲルを通して均一の強度のバンドを与える断片を生成する。このことはすべての放射活性断片にたいしX線フィルムの最適な暴露を得るために必須である。もし放射活性バンドの強度が変化していれば、より薄くなったバンドは検出されないであろう。全ての断片に均一な放射活性強度を得るには、DNAポリメラーゼはDNA上の各々の位置を同じ間隔および同じ時間で費やさなければならず、任意の位置での付加または除去に優先を示してはならない。このことは、もしDNAポリメラーゼに付随するエキソヌクレアーゼがなければ起こり、そのためそれはテンプレートに沿った各々の位置で鎖停止ヌクレオチドを取り込むただ一回の機会を持っているであろう。

【0076】短いプライマー

本発明のDNAポリメラーゼは好適には10塩基またはそれ未満、（より長いものも同様に）、最も好適には4-20塩基（例えば6塩基、これは3つのグループで使用でき18-merと等価物を形成する）のプライマーを利用することができる。短いプライマーを利用できる能力はDNAシーケンシングに多くの重要な利点を提供する。より短いプライマーは通常の17-merプライマーより安価であり、合成がより容易である。それらはより速くDNAテンプレート上の相補的的部位にアニールし、そのためシーケンシング反応をより速くする。さらに、DNAシーケンシングに小さな（例えば、6または7塩基）オリゴヌクレオチドプライマーを利用する能力は、長いDNA断片のシーケンシングにそれでは不可能な戦略を可能にする。例えば、80-4000ランダムヘキサマーを含むキットが発生でき、そのどれもがクローニングベクター内のどの部位とも相補的でない。統計的には80のヘキサマー配列の一つが配列決定されるべきDNA断片に沿って平均50塩基毎に生じるであろう。3000塩基の配列の決定にはただ5回のシーケンシングサイクルしか必要としないであろう。第一に、“普遍的”プライマー（例えば、New Engl and Biolabs #1211、配列5' GTAAACGAACGGCCAGT3'）が挿入物の一つの末端の約600塩基の配列に使用されるであろう。このシーケンシング反応の結果を用いて、決定された配列の末端近くの領域に相補的なキットから新しいプライマーが拾い上げられるであろう。第二のサイクルでは、次の600塩基の配列がこのプライマーを用いて決定されるであろう。この過程の5回の繰り返しにより、サブクローニングを必要とせず、および新規のオリゴヌクレオチドプライマーの化学的合成なしに3000塩基の完全な配列が決定されるであろう。そのような短いプライマーの使用はシーケンシング反応にT7の遺伝子2、5および遺伝子4タンパク質を含ませることにより促進されるであろう。

【0077】インビトロ突然変異誘発

ポリメラーゼ遺伝子の突然変異誘発は標準的なPCR技術（下記参照）を用いて実施された。

【0078】ddNTPの判別

唯一の二価カチオンとしてのマグネシウムの存在下、T7 DNAポリメラーゼは約3-4倍ddNTPを判別する（他の既知のどんなポリメラーゼよりも低い）。次に最も近いのは逆転写酵素であり、約10-50倍ddNTPを判別する（T7 DNAポリメラーゼの3-10倍）。これら二つに続いて、文献で特徴付けられているすべての他の既知のDNAポリメラーゼは少なくとも100倍、およびしばしば10,000倍またはそれ以上ddNTPを判別する。

【0079】マンガン存在下ではT7 DNAポリメラーゼおよび大腸菌DNAポリメラーゼIによる判別は減少する；T7 DNAポリメラーゼでは3.7から1へ減少し、および大腸菌DNAポリメラーゼIでは550から3.9に（ddATPに対して）減少した。出願者が最初に、唯一の二価カチオンとしてマグネシウムイオンの存在下100未満の連続移動性を持ち（プライマーテンプレートから解離する前に与えられたプライマーから伸長された平均の長さとして定義される；逆転写酵素はこの定義によると約150-200の連続移動性を持っており、T7 DNAポリメラーゼはこれより大きい連続移動性を持っている）、ddNTPの取り込みに対し100倍未満の判別を行うDNAポリメラーゼを提供した。対照的に、Taqのような既知のDNAポリメラーゼのほとんどは100未満の連続移動性を持ち、ddNTPの取り込みに対し100倍以上の判別を行う。

【0080】従来T7 DNAポリメラーゼのような高い連続移動性を持つポリメラーゼはプライマーテンプレートに数分の長さまで結合されたままで残り、大腸菌DNAポリメラーゼIのような低い連続移動性のポリメラーゼは一つのプライマーテンプレートから他のものへ数秒毎に（または100倍以上の頻度で）循環していると信じられていた。例えば、Tabor, et al. *J. Biol. Chem.* 262, 16212-16223 (1987) 参照。ジデオキシ取り込みからではない停止によるバックグラウンドを減少させるので連続移動性はDNAシーケンシングには都合のよいことであり、遅いサイクリング時間は欠点である。例えば、もしポリメラーゼが特定の配列で解離するとすれば、大過剰のポリメラーゼが存在しない限りシーケンシングゲル上に強い人工のバンドが生じるであろう。一方、急速に循環するポリメラーゼでは、一つの酵素分子がシーケンシング反応の経過中に多くの異なるプライマーを伸長させるであろうのでより少ないポリメラーゼで使用でき、およびプライマー末端は多くの異なるポリメラーゼ分子により伸長される機会を持つであろうので、強い特異的停止の機会を減少させる。

【0081】しかしながら、均一の強度のバンドを与えおよびより少ないddNTPの使用を可能にするため

に、急速に循環したddNTPを効率的に取り込むポリメラーゼがより良好である。そのようなポリメラーゼが低いエキソヌクレアーゼ活性を持つかまたは全く持たず、および加ピロリン酸分解によるバンドの分解を防ぐためピロホスファターゼを加えるのもまた好適である。

【0082】唯一の二価カチオンとしてマグネシウムでDNAシーケンシング反応を実施できることも好適である（すなわち、マンガン非存在下）。第一に、ポリメラーゼはマグネシウムに比べマンガンでより不活性になりがちである（例えば、Taborおよび Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4076-4080 (1989) 参照）。第二に、ポリメラーゼは広い範囲のマグネシウム濃度で活性である一方、最適活性はほとんどの場合に非常に鋭く、低い最適マンガン濃度が必要とされる（id）。および、最適マンガン濃度ではddNTPに対する判別の減少への効果が小さく、より高い濃度ではポリメラーゼの活性が落ちる。第三に、マンガンはキットに含ませるには都合のよい金属イオンではない；容易に沈澱を生じる（特に高いpHで）。第四に、マンガンがどの好熱性ポリメラーゼについてもddNTPの判別を減少させるための金属イオンとして効果があるのかどうか明かではない（すなわち、より高い温度で）。

【0083】本発明の前に、我々は判別と連続移動性の間に相関があると述べている（Taborおよび Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4076-4080 (1989)）。

【0084】”DNAポリメラーゼIは低い連続移動性を持っており、10ヌクレオチド未満の取り込み後に解離する。ddNTP非存在下のDNA合成の間に部位から酵素が解離する頻度およびその部位でのddNTPの取り込みに対する判別の程度の間に強い関係がある（未発表データ）。このことは、DNAポリメラーゼIは連続移動性合成の間はdNTPおよびddNTPを類似の速度で取り込む；しかしながら、合成が連続移動性でない場合、dNTPはddNTPに優先して取り込まれることを示唆している。このモデルはT7 DNAポリメラーゼと比較してのDNAポリメラーゼIによるddNTP取り込みのより大きな変異を説明できる、なぜなら、前者は後者に比べ2桁大きな値の連続移動性を持っているからである（引用省略）。

【0085】このように、我々はここに記載した突然変異体が突然変異体酵素の進行性を本当に増加させるという証拠を観察していないので、大腸菌DNAポリメラーゼIおよびTaq DNAポリメラーゼでの本発明の結果は驚くべきものである。

【0086】好熱性ポリメラーゼ

ddNTPに対する判別が100分の1以下である好熱性ポリメラーゼが特に本発明で有用である。さらに、唯一の二価カチオンとしてのマグネシウムの存在下ddNTPに対する判別が100分の1以下であり、好適には

一つのプライマー-テンプレートから別のものへのサイクルが1秒当たり1回またはそれ以上のものが有用である。好熱性ポリメラーゼは最適DNAポリメラーゼ活性が60℃以上で15分の反応性を持つポリメラーゼとして定義される。

【0087】均一バンド強度

マンガンはddNTPに対するクレノー断片の判別を550から3.9に減少させるが、TaborおよびRichards on (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 4076-4080(1989))は個々のバンドの強度にまだ広範囲の変異があること(図2参照 同上)を示している。このように、T7 DNAポリメラーゼから離れても、本発明はクレノー断片のように急速に循環するポリメラーゼおよび唯一の二価カチオンとしてのマグネシウムの存在下でも(ほとんどのポリメラーゼの活性に好適な条件、下記参照)均一な強度を持つバンドを産生する好熱性生物由来のポリメラーゼを初めて提供する。急速に循環する酵素は以下に記載した本分野では既知の方法により決定できる。

【0088】特異的ポリメラーゼ

これまでの情報から上に議論した望まれる性質を持つであろう以下のポリメラーゼを容易に作製することが可能である。もしエキソヌクレアーゼレベルが十分に低く、ポリメラーゼの活性が十分ならば(これらの両方とも本分野ではよく知られている)これらのポリメラーゼの各々をシーケンシング法に使用できる。各々のアミノ酸部位に関してはBraithwaiteおよびItoを参照されたい。

【0089】1. P10Iファミリー

Ph e 7 6 2 が変換された大腸菌DNAポリメラーゼI(変換とは非判別性を与える例えばTy r または等価なアミノ酸との置換を意味している)。

【0090】

【表3】Ph e 7 1 1 が変換されたストレプトコッカスニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) DNAポリメラーゼI

Ph e 6 6 7 が変換されたテルムス アクアチカス (*Thermus aquaticus*) DNAポリメラーゼI

大腸菌DNAポリメラーゼII

PRD1 DNAポリメラーゼ

Φ29 DNAポリメラーゼ

M2 DNAポリメラーゼ

T4 DNAポリメラーゼ

テルミュオコッカス リトラリス

(*Thermococcus litoralis*) DNAポリメラーゼ (Vent) Leu492-Tyr497

ピロコッカス フリウサス (*Pyrococcus feriosus*)

DNAポリメラーゼ

Leu489-Phe494

スルフォロブス ソルファタリカス

(*Sulfolobus solfataricus*) DNAポリメラーゼ

Val604-Thr609

ヒトDNAポリメラーゼ アルファ

Leu951-His956

S. セレビジエ (*cerevisiae*) DNAポリメラーゼI

(アルファ)

Leu945-His950

* Ph e 6 6 6 が変換されたテルムス フラバス (*Thermus Flavis*) DNAポリメラーゼI

Ph e 5 7 0 が変換されたバクテリオファージT5 DNAポリメラーゼ

Le u 5 2 6 が変換されたバクテリオファージSp o 1 DNAポリメラーゼ

Ph e 6 9 0 が変換されたバクテリオファージSp o 2 DNAポリメラーゼ

ミトコンドリアDNAポリメラーゼ、天然のTy r 7 5 3または非判別活性が減少されていないこの位置での変換体。そのようなポリメラーゼは以前にDNAシーケンシングに使用されたことはない。低レベルのddNTP判別性が期待されるのでそのような方法に有用であろうと信じられる。必要なら、ポリメラーゼ活性に付随するエキソヌクレアーゼ活性を減じるように修飾できるであろう。

【0091】2. ポリメラーゼアルファファミリー (ポリメラーゼIIファミリーとも呼ばれる)

Delarue et al., Protein Engineering 3, 461-467(199

0)はポリメラーゼの二つのファミリー(ポリメラーゼIファミリーおよびポリメラーゼアルファファミリー)が三つの共通のモチーフを共有していることを示している。彼らが”モチーフB”と呼んだ領域にジデオキシリボースの特異性に関する同定された残基が含まれている。この領域はポリメラーゼIファミリー中、配列KN₁N₂N₃N₄N₅N₆Y G(ここでN₄は特異的残基であり:もしN₄がフェニルアラニンであれば、高い判別性であり、もしN₄がチロシンであれば低い判別性である)により特徴付けられる。ポリメラーゼアルファファミリーにおいては、配列はKN₁N₂N₃N₄N₅N₆Y G

(保存残基との間では塩基が一つ少ない)。従ってポリメラーゼI型酵素とちょうど同じにこのモチーフ(リジン(K)およびチロシン(Y)の間)内の残基の変化がこれらのポリメラーゼのddNTPに対する判別度を減少させるであろう。これらの結果は以下の様である:

【表4】

Ile494-Phe499

Leu341-Ser346

Leu384-Leu389

Leu381-Leu386

Ile558-Leu563

Leu492-Tyr497

Leu489-Phe494

Val604-Thr609

Leu951-His956

Leu945-His950

| 35 | 36 |
|--|-----------------|
| <u>S. ポンベ (pombe) DNAポリメラーゼ I (アルファ)</u> | Leu931-His936 |
| <u>ドロソフィラ メラノガスター (Drosophila melanogaster)</u> | |
| DNAポリメラーゼアルファ | Leu960-His965 |
| <u>トリパノソーマ ブルーセイ (Trypanosoma brucei)</u> | |
| DNAポリメラーゼ アルファ | Leu845-His850 |
| ヒトDNAポリメラーゼ デルタ | Val695-Val700 |
| ウシDNAポリメラーゼ デルタ | Val694-Val699 |
| <u>S. セレビジエ (cerevisiae) DNAポリメラーゼIII</u> | |
| (デルタ) | Ile702-Val707 |
| <u>S. ポンベ (pombe) DNAポリメラーゼIII (デルタ)</u> | Val681-Val686 |
| 熱帯熱マラリアDNAポリメラーゼ (デルタ) | Ile692-Val697 |
| <u>S. セレビジエ (cerevisiae) DNAポリメラーゼII</u> | |
| (イプシロン) | Val82-Phe830 |
| <u>S. セレビジエ (cerevisiae) DNAポリメラーゼ Rev 3</u> | Leu1087-Thr1092 |
| 単純ヘルペスウイルス タイプ1 DNAポリメラーゼ | Val812-Val817 |
| エキンヘルプスウイルス タイプ1 DNAポリメラーゼ | Val813-Val818 |
| 水痘帯状ヘルペスウイルス DNAポリメラーゼ | Val776-Val781 |
| エプスタインバーウイルス DNAポリメラーゼ | Cys682-Val687 |
| ヘルペスウイルス サイミリ DNAポリメラーゼ | Val671-Val676 |
| ヒトサイトメガロウイルス DNAポリメラーゼ | Val811-Phe816 |
| マウスサイトメガロウイルス DNAポリメラーゼ | Val717-Phe722 |
| ヒトヘルペスウイルス タイプ6 DNAポリメラーゼ | Ile667-Val672 |
| 湖水ナマズウイルス DNAポリメラーゼ | Ile750-His755 |
| クロレラウイルス DNAポリメラーゼ | Ile586-Val591 |
| 鶏頭ウイルス DNAポリメラーゼ | Ile648-Val653 |
| ワクシニアウイルス DNAポリメラーゼ | Ile637-Val642 |
| <u>コリストニューラ ビエニス (Choristoneura biennis)</u> | |
| DNAポリメラーゼ | Ile669-Leu674 |
| <u>オートグラフィア カリホルニカ (Autographa californica)</u> | |
| 核多面化ウイルス (AcMNPV) DNAポリメラーゼ | Arg606-Ile611 |
| マイマイガ核多面化ウイルスDNAポリメラーゼ | Arg624-Ile629 |
| アデノウイルス-2 DNAポリメラーゼ | Leu696-Leu701 |
| アデノウイルス-7 DNAポリメラーゼ | Leu762-Leu767 |
| アデノウイルス-12 DNAポリメラーゼ | Leu694-Leu699 |
| S-1 トウモロコシDNAポリメラーゼ | Leu618-Leu623 |
| <u>カリオ ニューロスボラ インターメディア</u> | |
| (<u>Kalio neurospora intermedia</u>) DNAポリメラーゼ | Leu776-Leu777 |
| <u>p A I 2 アスコボラス イマーサス</u> | |
| (<u>Ascobolus immersus</u>) DNAポリメラーゼ | Leu951-leu956 |
| <u>p C L K 1 クラビセプス プルプレア</u> | |
| (<u>Claviceps purpurea</u>) DNAポリメラーゼ | Leu831-Leu836 |
| <u>マランハル ニューロスボラ クラッサ</u> | |
| (<u>Maranhar neurospora crassa</u>) DNAポリメラーゼ | Leu752-Leu757 |
| <u>p E M アガリカス ビトルキス</u> | |
| (<u>Agricus bitorquis</u>) DNAポリメラーゼ | Leu573-Leu578 |
| <u>p G K L 1 クライペロマイセス ラクチス</u> | |
| (<u>Kluyveromyces lactis</u>) DNAポリメラーゼ | Ile785-Leu790 |
| <u>p G K L 2 クライペロマイセス ラクチス</u> | |
| (<u>Kluyveromyces lactis</u>) DNAポリメラーゼ | Ile770-Gly776 |
| <u>p S K L サッカロマイセス クライベリ</u> | |

上述のポリメラーゼのうち代表的なものについて、対応する位置のアミノ酸残基を以下に示す。

生物

| |
|-----------------------------|
| Thermus aquaticus |
| Streptococcus pneumoniae |
| Bacillus stearothermophilus |
| Bacillus caldodenax |
| Deinococcus radiodurans |
| Thermus thermophilus |
| Thermus flavus |
| Phage SP01 |
| Phage SP02 |

* 【表5】

遺伝子バンク

| |
|----------------|
| D32013 |
| J04479 |
| L42111 |
| D12982 |
| L14581 |
| D28878 |
| X66105 |
| M84415 |
| X01458, K02752 |

部分配列

*

| |
|----------------|
| RRAAKTINFGVLYG |
| RRNAKAVNFGVVYG |
| RRQAKAVNFGIVYG |
| RRQAKAVNFGIVYG |
| RRAAKTVNFGVLYG |
| RRAAKTVNFGVLYG |
| RRAAKTINFGVLYG |
| RTASKKIQFGIVYQ |
| RQKGKVAELALGYQ |

*

【0093】

【実施例】以下は種々のポリメラーゼの連続移動性およびサイクル時間を決定するための方法の実施例である。また、ポリメラーゼによる判別レベルを決定するための実施例および本発明に有用なその他の方法が提供されている。

【0094】実施例1. DNAポリメラーゼ遺伝子の突然変異誘発および突然変異体DNAポリメラーゼの過剰産生

突然変異体DNAポリメラーゼ遺伝子のクローニングおよび発現には標準的な技術が使用された。大腸菌DNAポリメラーゼIの大フラグメント(クレノー断片)およびTaq DNAポリメラーゼの大フラグメント(KlenTaqまたはTaq DNAポリメラーゼ、Barnes, 112 Gene 29, 1992参照、またはStoffel断片、Lawyer et al, 2 PCR Methods Appl 275, 1993参照)、大腸菌DNAポリメラーゼIおよびTaq DNAポリメラーゼにおける突然変異体発生のための出発材料はT7 RNAポリメラーゼプロモーターの制御の下で発現された。T7 DNAポリメラーゼの突然変異体のための出発材料であるT7 DNAポリメラーゼの28アミノ酸欠失のための遺伝子(TaborおよびRichardson 264, J. Biol. Chem. 6447, 1989参照)はlacプロモーターの制御下、T7 DNAポリメラーゼによる連続移動的DNA合成に必要な因子である大腸菌チオレドキシン(TaborおよびRichardson、上記文献)を産生する株中で発現された。Taq DNAポリメラーゼ突然変異体F667Yのための遺伝子はPCRおよび制限消化に続いての連結を用いる標準的技術によりTaq DNAポリメラーゼを産生する遺伝子から完全長Taq DNAポリメラーゼを産生する遺伝子に移された。

【0095】突然変異体DNAポリメラーゼを作製するための突然変異発生はSarkarおよびSommer 8 Bio Techniques 404, 1990により記載されている方法に類似したPCRによる標準突然変異発生技術を用いて実施された。

※4より多いのアミノ酸残基が交換されているハイブリッドを作製するためには、2つのハイブリッドプライマーが作製され、それによりPCRが最初に供与体DNA上で実施され、続いてその生成物がハイブリッド分子を発生する受容体DNA上でのPCRに使用された。領域の交換が4アミノ酸またはそれ未満のハイブリッドの作製には、移されるべき全領域ならびに受容体の適当なフランキンク配列を含む単一のPCRプライマーが合成され、そのプライマーが直接ハイブリッド分子の作製に使用される。

【0096】突然変異体DNAポリメラーゼの過剰産生は標準技術を用いて実施された(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al, eds., 16章, 1994参照)。突然変異体蛋白質はイオン交換クロマトグラフィーを含む常法により精製された。大腸菌DNAポリメラーゼI突然変異体の精製には、例えばJoyceおよびGrindley 80 Proc. Natl. Acad. Sci. 1830, 1983を参照されたい。Taq DNAポリメラーゼ突然変異体の精製には、例えばEngelke et al. 191 Analytical Biochemistry 396, 1990を参照されたい。T7 DNAポリメラーゼ突然変異体の精製には、例えばTaborおよびRichardson 264, J. Biol. Chem. 6447, 1989を参照されたい。各々の精製された突然変異体蛋白質のポリメラーゼ特異的活性はこれらの引例に記載されている標準法により決定された。

【0097】実施例2. デオキシヌクレオチドに比較してジデオキシヌクレオチドの取り込み効率が改良された突然変異体のためのDNAポリメラーゼの迅速なスクリーニング

SDS活性ゲル分析により突然変異体DNAポリメラーゼのジデオキシヌクレオチド取り込み能力がスクリーニングされた。方法はSpanosおよびHubscher 91 Methods in Enzymology 263, 1983およびKarawya et al. 135 Analytical Biochemistry 318, 1983により記載されている方法を改良したものである。簡単に記すと、10mlの細胞

が4から6時間誘導されその後ペレット化される。細胞ペレットを0.3ml 25mM トリスHCl, pH7.0, 5mM EDTAに懸濁する。20 μ lの再懸濁化された細胞を1%SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、2%メルカプトエタノール、30%グリセロール、0.04%プロモフェノールブルーおよび100mM トリスHCl, pH6.8を含む溶液40 μ lと混合する。混合物を37℃で5分間インキュベートし、その20 μ lずつを二重に二つのSDSポリアクリルアミドゲル上にのせる。SDSポリアクリルアミドゲルは、8%ポリアクリルアミド、0.27%ビスアクリルアミド、190mM トリスHCl, pH8.8、0.05%SDS、および25 μ g/ml変性サケ精子DNAを含む分解用ゲルおよび5%ポリアクリルアミド、0.17%ビスアクリルアミド、150mM トリスHCl, pH6.8、および0.1%SDSを含む濃縮用ゲルからなっている。二つのゲルは190mM トリスHCl, pH8.8および0.05%SDSからなる電気泳動緩衝液中、13℃の一定温度にて100Vで13時間電気泳動する。

【0098】電気泳動後、4℃にて8時間以上かけ、その間各々500mlの還元緩衝液(50mM トリスHCl, pH7.5、5mM酢酸マグネシウム、1mMジチオスレイトール、40mM MKCl、400 μ g/mlウシ血清アルブミン、16%グリセロールおよび0.95mMEDTA)を4回交換して洗浄する。

【0099】還元蛋白質は6mlの還元緩衝液、1.5 μ Mの4dNTP、4 μ lの[α -³²P]dATP(800Ci/ミリモル、10mCi/ml)および80 μ gの精製チオレドキシニン中、二つのゲルの各々をインキュベートすることによりDNAポリメラーゼ活性がアッセイされる。混合物の一つはまた30 μ MのddTTP(ddTTPに対して20倍モル過剰)も含む。混合物は37℃で4時間インキュベートした(好熱性DNAポリメラーゼに対しては70℃で2時間)。

【0100】インキュベーション後、ゲルを5%トリクロロ酢酸および1%ピロリン酸ナトリウムを4回交換して8時間洗浄した。次にゲルを乾燥しオートラジオグラフィを行った。

【0101】ddTTPに対する突然変異体DNAポリメラーゼの判別が上がったかまたは下がったかを決定するために、ddTTP存在下または非存在下でインキュベーションを行った二つのゲル上の放射活性バンドの強度を比較し、非修飾DNAポリメラーゼの二つのバンドの信号の比が各々の突然変異体の二つのバンドの信号の比と比較された。もし突然変異でDNAポリメラーゼのddTTPに対する判別が悪くなっていたら、非修飾DNAポリメラーゼに比較して突然変異体DNAポリメラーゼのddTTPが存在するバンドの放射活性の大きな比率の低下があるであろう。例えばこれらの条件下ddTTP存在下または非存在下で実施される反応において、誘導された大腸菌DNAポリメラーゼIまたはT7 DNAポリメラーゼ突然変異体Y526Fを含む細胞で観察された放射活性バンドはほとんど同じ強度(2倍

以内)である。対照的に、誘導された大腸菌DNAポリメラーゼI突然変異体F726YまたはT7 DNAポリメラーゼ含有細胞では、ddTTP存在下で実施された反応のゲル上のバンドはddTTP非存在下で実施された反応での対応するバンドの強度の5%未満であった。

【0102】このアッセイはジデオキシヌクレオチドの判別能力を多数のDNAポリメラーゼ突然変異体についてスクリーニングする迅速な方法として示されている。判別の相対的速度の少なくとも5倍の変化を検出できる。しかしながら、このアッセイの後興味を引く可能性のある突然変異体DNAポリメラーゼの精製、および各々の突然変異体のジデオキシヌクレオチドの判別に対する影響を正確に決定するために以下に記載したような精製蛋白質のより厳密なアッセイで追試を行わなければならない。

【0103】以下の実施例は、種々のポリメラーゼに対する連続移動性およびサイクル時間の決定法、ポリメラーゼによるddNTPに対する判別レベルの決定法、DNAシーケンシングゲル上のジデオキシ停止断片により発生したバンドの均一性の決定法およびDNA配列分析における本発明のDNAポリメラーゼの使用法である。

【0104】実施例3. 一本鎖M13 DNA-5' ³²P-標識40-merプライマー複合体の製造と精製
テンプレートは米国特許第4,795,699号に記載されているような9950の長さのヌクレオチド、M13 mGP1-2一本鎖DNAである(図9)。ファージM13 mGP1-2はATCCに第40303号として寄託されている。M13 mGP1-2一本鎖DNAはTabor et al., 262 J. Biol. Chem. 16212, 1987に記載されているごとく精製された。簡単に記すと、ファージは2回のCsCl濃度勾配遠心分離により精製され、CsClを透析により除去し、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム存在下でフェノールおよびクロロホルムによりファージからDNAを除去し、抽出されたDNAは20mM トリスHCl, pH7.5、2mMEDTAに対してよく透析し、4℃で貯蔵した。M13 mGP1-2一本鎖DNAの濃度は8.1A₂₆₀単位=1mg/mlまたはマイクロリットル当たり0.3ピコモルM13 mGP1-2テンプレートの吸光係数を用いて分光測定により決定される。

【0105】プライマーは常法により合成された配列5'(TTTCCCAGTCAAGACGTTGTAACGACGCCAGTGCCA)3'を持つ合成40-merである。これはM13 mGP1-2 DNAのヌクレオチド9031から8992と相補的である(配列は上記特許'699参照)。プライマーは末端標識に先立ってイオン交換クロマトグラフィーまたは変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製する。

【0106】プライマーは本質的にTabor et al (上記文献)に記載されているごとく標識化されテンプレート

にアニールされる。プライマーは40mMトリスHCl, pH 7.5、10mM MgCl₂、5mMジチオスレイトール、100mM NaCl、50μg/ml BSA、50μCi [g³²P] ATP、6000Ci/mmol、5ピコモルのプライマーおよびホスファターゼ活性を持たないP_{se}T 1突然変異体から調製された10単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼを含む反応混合物(15μl)中で5'末端標識された。混合物は37℃で15分、続いてキナーゼを不活性化するため70℃で15分インキュベートする。60μlの一本鎖M13 mGP1-2 DNA (0.25mg/ml)、6μlの1M NaClおよび3μlの0.2M MgCl₂を加え、混合物は30分以上かけて徐々に70℃から室温(約20-25℃)まで冷却する。混合物は次にフェノールおよびクロロホルムの1:1混合物で抽出し、マイクロ遠心機で30秒遠心分離した後、水層(70μl)を20mMトリスHCl, pH7.5、2mMEDTA、100mM NaClで平衡化したセファロースCL-6Bの1mlのカラムにのせる。標識プライマー-テンプレート複合体は平衡化に用いたものと同じ緩衝液でカラムから溶出される; 標識化合物は空隙容量中に溶出される。溶出後、複合体は約200,000cpm/μlの比活性を有する約50μg/ml (μlあたり0.015ピコモル分子)の濃度である。

【0107】実施例4. 希釈試験によるDNAポリメラーゼの連続移動性の決定

連続移動性は本質的にTabor et al (上記文献) およびTaborおよびRichardson, 84 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 4767, 1987に記載されている酵素希釈により決定された。反応はDNAシーケンシングに使用された伸長/停止反応と同一の条件で実施されたが(TaborおよびRichardson、上記文献)、ddNTPは除いてあり、およびいくつかの反応ではポリメラーゼ分子より過剰のプライマー-テンプレート分子を存在させるためポリメラーゼ濃度が減らされている。プライマー-テンプレートは実施例3に記載したような一本鎖M13 DNAにアニールされた一つの5'末端標識プライマーから成っている。

【0108】伸長反応混合物は実質的にTabor et al (上記文献)に記載されているように調製された。各々の反応混合物(18μl)は1.0μlの実施例3に記載されたようなアニールされた³²P-標識プライマー-M13 DNA (~0.015ピコモル、~200,000cpm)、40mMトリスHCl, pH8.0、5mM MgCl₂、5mMジチオスレイトール、および300μM dNTPを含む。混合物は37℃(好熱性DNAポリメラーゼでは70℃)で1分間インキュベートされた。反応は分析されるDNAポリメラーゼの希釈液(20mMトリスHCl, pH7.5、10mMメルカプトエタノール、および0.05%ウシ血清アルブミンで希釈されている)2μlを加えることにより開始された。反応混合物はさらに37℃(好熱性DNAポリメラーゼでは70℃)で30秒または3分間インキュベートされた。指定時間に8μlを採り、変性ポリアクリルアミドゲル電

気泳動のためには8μlの90%ホルムアミド、20mMEDTA、0.05%ブロムフェノールブルーかまたはアルカリ性アガロースゲル電気泳動のためには2μlの100mMEDTA、2%ドデシル硫酸ナトリウムに加えられた。

【0109】試料は変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動かまたはアルカリ性アガロースゲル電気泳動で分析される。変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動は平均連続移動性が500ヌクレオチド未満のポリメラーゼの分析に最も適しており、一方、アルカリ性アガロースゲル電気泳動は500ヌクレオチドより大きい平均連続移動性を持つDNAポリメラーゼの連続移動性のより感度のよい評価を与える; しかしながら、両方の方法とも任意のDNAポリメラーゼの平均連続移動性の決定に十分使用できる。

【0110】変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により連続移動性を決定するには、ホルムアミド中の試料を90℃に2分間加熱し、直後に各々の試料の6μlを8%ポリアクリルアミド、0.4%N,N'-メチレンビスアクリルアミド、7M尿素を溶解した100mMトリス-ホウ酸, pH8.3、1mMEDTAからなるゲル上にのせる。電気泳動は2000Vで90分である(ブロムフェノールブルーがゲルのボトムをちょうど流出するまで)。また適した5'³²P-末端標識分子量マーカーもゲルにのせると、100から500の長さの断片の大きさの決定が可能である。そのような適したマーカーの例は、常法を用いてアルカリ性ホスファターゼで脱リン酸化され、次に[g³²P]ATPおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて5'³²P-末端標識されているT7 HpaI断片である(Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning A Laboratory*

Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. pp.6.20-6.21およびAusubel et al., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.)。電気泳動後、真空下ゲルを乾燥させオートラジオグラフィを行う。オートラジオグラフィ後、放射活性標識断片の分布をホスホイメージャー分析(Molecular Dynamics)で決定する。

【0111】アルカリ性アガロースゲル電気泳動による生成物は(1)Villani et al., 256 *J. Biol. Chem.* 8202, 1981, (2)Sabatino et al., 27 *Biochemistry* 2998, 1988 (3) Sambrook, et al. (上記文献)に記載されているごとく分析された。アガロースゲルの調製には1.5%アガロースを含む2mMEDTA溶液, pH8.0 (250ml)を電子レンジ中で加熱してアガロースを溶解させた後放置して60℃に冷却する。8.75mlの1N NaOH (最終濃度35mMのNaOH)を加え、そのゲルをアガロースゲル電気泳動流し型に注ぐ。ゲルは使用2時間前に準備する。電気泳動緩衝液は35mM NaOHおよび2mMEDTAである。上に記載したような10μlの試料(20mMEDTA、0.4%ドデシル硫酸ナトリウム)に1μlの1N NaOHを加え60℃で10分間加熱する事により変性させて電気泳動試料

を調製する。各々の試料に7 μ lの75%グリセロール、0.2%ブルモクレゾールグリーンを加えた後試料をアルカリ性アガロースゲル上にのせる。電気泳動は4℃にて150mAの一定電流で15時間実施する(ブルモクレゾールグリーンが約14cm移動するまで)。電気泳動チャンバーは26cm(長さ)x20cm(幅)x2cm(高さ)である。電気泳動後、ゲルを10%トリクロロ酢酸に2時間浸し、真空中乾燥後オートラジオグラフィを行う。オートラジオグラフィ後、放射活性標識断片の分布をホスホイメージャー分析(Molecular Dynamics)で決定する。

【0112】DNAポリメラーゼの連続移動性を試験するため、プライマーの部分のみが(例えば25%)伸長されるが大多数(例えば75%)は未変化で残るまで反応混合物中のそのポリメラーゼ濃度を2倍ずつ希釈する(40ヌクレオチドの長さ)。これらの条件下DNAポリメラーゼ濃度の2倍の増加または減少は伸長されるプライマーの分画の約2倍の増加または減少を生じるはずである。伸長された標識断片の平均の長さはオートラジオグラフィの視覚的検査またはホスホイメージャーを用いる定量により決定される。例えばこの試験を用い、その連続移動因子チオレドキシンと複合体化されているエキソヌクレアーゼ欠損T7 DNAポリメラーゼ(例えば、SEQUENASE Version2, United States Biochemical Corporation)は500ヌクレオチドより大きな平均連続移動性を持っているが、大腸菌DNAポリメラーゼIのクレノー断片は50ヌクレオチド未満の連続移動性しか持っていない事が示された。

【0113】実施例5. DNAポリメラーゼのサイクル速度の決定

サイクルの速度は本質的にTabor et al(上記文献)に記載されているごとく決定された。反応はDNAシーケンシングに使用された伸長/停止反応と同一の条件で実施されたが(TaborおよびRichardson、上記文献)、ddNTPは除いてあり、およびいくつかの反応ではポリメラーゼ分子より過剰のプライマー-テンプレート分子を存在させるためポリメラーゼ濃度が減らされている。プライマー-テンプレートは実施例3に記載したような一本鎖M13 DNAにアニールされた一つの5'末端標識プライマーから成っている。

【0114】最初に例えば大腸菌DNAポリメラーゼIの大フラグメント(クレノー断片)を用いてポリメラーゼ分子に対するプライマー-テンプレート分子の機能的割合を決定するための試験が実施される。10秒で標識プライマー-テンプレート分子の20%を伸長させるのに必要なポリメラーゼ分子の濃度を決定するため、実施例4に記載したごとく希釈実験が実施される。プライマー-テンプレートに対するポリメラーゼのこの割合は1:5に等しいかまたはそれ未満であるように規定されており、以下のようにポリメラーゼのサイクルの最大速度の決定に使用される。

【0115】前の節に規定したように1:5に等しいかまたはそれ未満であるプライマー-テンプレートに対するポリメラーゼの比を用いて実施例4に記載したように伸長反応が実施される。反応は試験されるポリメラーゼに最適な条件下(すなわち、緩衝液、pH、塩、温度)実施される。10秒、20秒、40秒および80秒後に一部を採取し、反応を停止させて実施例4に記載したように生成物を分析した。大腸菌DNAポリメラーゼIの大フラグメントのように低い連続移動性(100ヌクレオチド未満)を持つDNAポリメラーゼにおいて、試料は好適には変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析された。T7 DNAポリメラーゼのように高い連続移動性(100ヌクレオチド以上)を持つDNAポリメラーゼにおいて、試料は好適にはアルカリ性アガロースゲル電気泳動により分析された。電気泳動後、ゲルを真空中乾燥させオートラジオグラフィまたはホスホイメージャーで分析した。

【0116】T7 DNAポリメラーゼのように非常にゆっくりとサイクルするポリメラーゼで反応を実施する場合、10秒および80秒の間で伸長されなかったプライマーの数に有意な減少(すなわち、2倍未満)はなかった。それ故、10秒および80秒の時点の間に非伸長標識プライマーの数が2倍以上減少しないならば、DNAポリメラーゼは70秒に1度より遅くサイクルしている。急速にサイクルするポリメラーゼに対しては10秒および80秒の時点の間で非伸長プライマーの数が著しい割合で(すなわち2倍以上)で減少するであろう。これらのポリメラーゼのサイクルの速度を決定するため、以下の方程式が使用される：

$$R = N_1 \times L(t_2) / \{ L(t_1) \times (t_2 - t_1) \}$$

式中：

R=サイクルの最小速度(秒当たりのサイクル)；

N₁=機能的DNAポリメラーゼ分子に対するプライマー-テンプレート分子の比(上記の実施例ではN₁=5)；

L(t₁)=試験されているDNAポリメラーゼの最大連続移動性(ヌクレオチド)。実施例3に記載したごとくDNAポリメラーゼを制限した条件下(10秒の時点でプライマーの20%のみしか伸長されない)標識プライマーから伸長されるヌクレオチドの最大数として定義される；

L(t₂)=時間t₂(この実施例では80秒)での標識プライマーの伸長の最大長(ヌクレオチド)；

t₁=試料の一部が採取される最も短い時間、またはこの実施例では10秒；

t₂=試料の一部を採取する前に反応が進行させられる最も長い時間、またはこの実施例では80秒。

【0117】この試験が大腸菌DNAポリメラーゼIの大フラグメントについて実施された場合、秒当たり0.2サイクルより大きい値が得られた。

【0118】実施例6および7は一本鎖M13 DNAテンプレートにアニールされた一つの5' ³²P標識4-merプライマーおよびゲル電気泳動に基づいた分析を用いる未知のDNAポリメラーゼについてジデオキシヌクレオチドの取り込みの効率を決定するための試験法を提供する。実施例6はジデオキシヌクレオチドを効率的に取り込むDNAポリメラーゼ（例えば、野生型T7 DNAポリメラーゼおよびTaq DNAポリメラーゼF667Y）に最適であり、一方、実施例7はジデオキシヌクレオチドの取り込みを強く判別するDNAポリメラーゼ（例えば、T7 DNAポリメラーゼY526Fおよび野生型Taq DNAポリメラーゼ）に最適である。

【0119】実施例6. 1:1のdNTPとddNTPの比を用いるデオキシヌクレオチドと比較したジデオキシヌクレオチドの取り込み速度のゲル電気泳動による決定

この試験の最初の応用はT7 DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼI突然変異体F762YまたはTaq DNAポリメラーゼ突然変異体F667Yのようにジデオキシヌクレオチドを効率的に取り込むDNAポリメラーゼにおけるdNTPに対するddNTPの取り込みの絶対的な比の決定である。任意のDNAポリメラーゼのddNTPに対する判別の程度を示す事もできる；しかしながら、T7 DNAポリメラーゼ突然変異体Y526F、大腸菌DNAポリメラーゼIまたはTaq DNAポリメラーゼのようにddNTPを強く判別するDNAポリメラーゼに対しては判別の程度を正確に決定するにはdNTPに対して高い比率のddNTPが必要であり、それは実施例7に詳細に記載されている。

【0120】DNA合成反応は実施例3に記載したごとく調製された³²P-末端標識4-mer-M13mGP1-2 DNAテンプレート複合体で実施される。反応の緩衝液、pH、塩および温度に関しては、試験されているDNAポリメラーゼに最適な反応条件が使用された。DNAポリメラーゼ濃度は10分の反応でプライマーのほとんどが伸長され、およびジデオキシヌクレオチドの取り込みにより停止されるように選択された。反応混合物は100μMの4dNTPおよび100μMの4つのddNTPの内の1つを含む。

【0121】4つのddNTPの各々を取り込む6つのDNAポリメラーゼの能力を比較するためにこの試験を使用した。試験されたDNAポリメラーゼは（1）エキソヌクレアーゼ領域に28アミノ酸が欠損し、およびチオレドキシンと1対1の比で複合体を形成しているT7

DNAポリメラーゼ（TaborおよびRichardson 264, *J. Biol. Chem.* 6447, 1989）（“T7 DNAポリメラーゼ”とここで称されている）、（2）大腸菌DNAポリメラーゼIの大フラグメント、通常クレノー断片と呼ば

れている（“大腸菌DNAポリメラーゼI”とここで称されている）、（3）*Thermus aquaticus*からの非修飾DNAポリメラーゼ（“Taq DNAポリメラーゼ”とここで称されている）、

（4）残基526のチロシンがフェニルアラニンに変換されている前記のT7 DNAポリメラーゼ（“T7 DNAポリメラーゼY526F”とここで称されている）、（5）残基762のフェニルアラニンがチロシンに変換されている上記の大腸菌DNAポリメラーゼ

I（“大腸菌DNAポリメラーゼI F762Y”とここで称されている）および（6）残基667のフェニルアラニンがチロシンに変換されている上記のTaq DNAポリメラーゼ（“Taq DNAポリメラーゼF667Y”とここで称されている）である。

【0122】対応するdNTPと比較した4つのddNTPの各々の使用の相対速度を上にしたDNAポリメラーゼについて試験するために、反応混合物（8μl）には1.0μlの実施例3に記載されたようなアニールされた³²P-標識プライマー-M13 DNA（〜0.015ピコモル、〜200,000cpm）、40mMトリスHCl, pH8.0、5mM MgCl₂、5mMジチオスレイトール、50mM NaCl、100μM 4dNTP、および100μM ddCTPが含まれている。反応混合物にはまた、DNAポリメラーゼによる明かな判別を増加させるであろう加ピロリン酸分解

（pyrophosphorolysis, TaborおよびRichardson 265 *J. Biol. Chem.* 8322, 1990）を阻害するために10ngの酵母無機ピロホスファターゼが含まれている。20mMトリスHCl, pH7.5、10mM 2-メルカプトエタノール、および0.05%ウシ血清アルブミンに希釈した約0.025単位/μlの濃

度までの各々のDNAポリメラーゼ2μlの添加により反応が開始された。各々のDNAポリメラーゼの濃度は、15分の反応でddNTP非存在下、標識プライマーのほとんどを500ヌクレオチドより長く伸長するのに十分であった。反応混合物は37℃（T7 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼY526F、大腸菌DNAポリメラーゼIおよび大腸菌DNAポリメラーゼI F762Y）または70℃（Taq DNAポリメラーゼおよびTaq DNAポリメラーゼF667Y）で15分インキュベートされた。反応は10μlの90%ホルムアミド、20mM EDTA、0.05%プロモフェノールブルーの添加により停止させた。ゲルにのせる直前に試料を90℃で2分間加熱し、各々の試料の6μlを8%ポリアクリルアミド、0.4% N, N'-メチレンビスアクリルアミド、7M尿素を含む100mMトリス-ホウ酸, pH8.3、1mM EDTAから成るゲル上にのせる。電気泳動は2000Vで90分であった（プロモフェノールブルーがゲルのボトムをちょうど流出するまで）。電気泳動後、真空下ゲルを乾燥させオートラジオグラフィを行う。オートラジオグラフィ後、放射性標識断片の分布をホスホロイメジャー分析（Molecular Dynamics）で決定する。も

しくは、ジデオキシ停止バンドの相対的強度がSciScan 5000イメージングデンシトメーター (United States Biochemical Corp) のような装置を用いてオートラジオグラムを走査することにより決定できるであろう。

【0123】四つの反応の組が(各々はddNTPと当モデル濃度の単一のddNTPを含む)上記の六つのDNAポリメラーゼの各々と実施された場合、DNAポリメラーゼの三つとの反応(T7 DNAポリメラーゼY526F、大腸菌DNAポリメラーゼIおよびTaq DNAポリメラーゼ)の結果では伸長されたプライマーの放射活性のほとんど(>50%)がゲルの先端まで(300塩基より長い断片に対応する)移動した。断片の大きさの増加にともなう信号の予想される指数関数的減衰に基づく、このことはこれら三つのDNAポリメラーゼによる判別は四つ全てのddNTPに対して100倍より大きかったことに対応する。これら三つのDNAポリメラーゼによるddNTPに対する判別の正確な測定は下記実施例7の試験を用いて得られる。

【0124】他の三つのDNAポリメラーゼ(T7 DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼI F762YおよびTaq DNAポリメラーゼF667Y)におけるオートラジオグラムは全ての反応において一連のジデオキシ停止断片を示した。一般に、標識合成断片の平均の長さはTaq DNAポリメラーゼF667Yが最も低く、フィルムに数日暴露しても約六つの放射活性標識ジデオキシ停止断片しか認められなかった。大腸菌DNAポリメラーゼI F762Yによる標識断片の平均の長さはTaq DNAポリメラーゼF667Yによるものよりもわずかに長く、T7 DNAポリメラーゼよりも著しく長かった。T7 DNAポリメラーゼに

ポリメラーゼ反応

| | ddGTP | ddATP | ddTTP | ddCTP |
|----------------|-------|-------|-------|-------|
| T7 DNA | | | | |
| ポリメラーゼ | 67% | 66% | 76% | 61% |
| 大腸菌 DNA | | | | |
| ポリメラーゼ I F762Y | 95% | 92% | 96% | 92% |
| Taq DNA | | | | |
| ポリメラーゼ F667Y | 97% | 95% | 95% | 99% |

ジデオキシヌクレオチドを取り込む各々のDNAポリメラーゼの効率のさらに別の試験として、有意の信号を持つ各々の断片中のカウンタ数が各々の反応に対して決定され、データがマッキントッシュプログラムKaleidograph 3.0版 (Synergy Software) を用いて断片数の関数としてプロットされた。得られたプロットはKaleidographライブラリルーチンを用いて指数関数的減衰曲線に適合された。減衰曲線は下記の方程式で与えられる:

$$Y = e^{-MX}$$

式中:

$Y = 1 -$ (伸長可能なプライマーの総数と比較した断片1からX中の標識プライマーの分画)

* より合成された場合より大腸菌DNAポリメラーゼI F762YおよびTaq DNAポリメラーゼF667Yにより合成された場合の方が断片はより均一の強度であった。

【0125】断片中の放射活性の分布はホスホイメージャー分析 (Molecular Dynamics) により定量された。各々のレーンの標識プライマーの総量はDNAポリメラーゼが存在していない三つの対照反応を行うことにより決定され、非伸長プライマーの位置のゲル上の各々の対応する放射活性バンドの放射活性が決定された。放射活性標識プライマーのいくつかの調製試料では、あるパーセント(<10%)は使用されたDNAポリメラーゼの濃度に関係にどんなDNAポリメラーゼによっても伸長されなかった; このバックグラウンドレベルはddNTPを含む一連の四つの反応の非伸長プライマーの位置に残っている放射活性のパーセントを測定し、先に決定されたカウンタ総数からこれらの4つの値の平均を差し引くことにより決定される。この値はDNAポリメラーゼにより伸長され得るプライマーのカウンタ総数として定義される。

【0126】最初の三つのジデオキシ停止断片のカウンタ総数(すなわち、放射活性)が4つのddNTPの各々に対しT7 DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼI F762YおよびTaq DNAポリメラーゼF667Yについて決定された。値はDNAポリメラーゼにより伸長され得るプライマーのカウンタ総数に対する最初の三つのジデオキシ停止断片のカウンタ数のパーセントとして下記の表に示されている。

【0127】

【表6】

※ X = 断片数 (第一のジデオキシ停止断片が1である)

M = データに対しKaleidographライブラリルーチンにより計算させた指数関数的減衰関数。

【0128】下記の表においてT7 DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼI F762YおよびTaq DNAポリメラーゼF667Yを用いる4つのddNTP反応の各々について以下のデータが提供される: N、各々の指数関数曲線への適合に使用された断片の数M、上記のように計算された指数関数的減衰関数D、特定のddNTPの使用を対応するddNTPの使用に対する比として与えられた判別因子(両方のヌクレオチドが等しい濃度で存在するとき)。DはX=1の時の

Yを決定するためのMの計算値を用いて上記の式から計算され、ddNTPに対してdNTPを優先する比をY/(1-Y)としてDが定義される。

【0129】R²、データの相関指数、Kaleidographライブラリールーチンにより計算される。これはバンド強 *

| ポリメラーゼ | ddNTP | N | M | D | R2 |
|----------|---------|---|--------|------|-------|
| T7 DNA | ddGTP | 8 | -0.375 | 2.2 | 0.813 |
| ポリメラーゼ | ddATP | 6 | -0.356 | 2.3 | 0.996 |
| | ddTTP | 5 | -0.450 | 1.8 | 0.997 |
| | ddCTP | 8 | -0.317 | 2.7 | 0.889 |
| 大腸菌DNA | ddGTP | 5 | -1.03 | 0.56 | 0.999 |
| ポリメラーゼ I | ddATP | 5 | -0.860 | 0.72 | 0.998 |
| F762Y | ddTTP | 5 | -1.06 | 0.54 | 1.000 |
| | ddCTP | 6 | -0.842 | 0.75 | 1.000 |
| Taq DNA | ddGTP | 5 | -1.18 | 0.45 | 0.995 |
| ポリメラーゼ | ddATP | 6 | -0.997 | 0.59 | 0.997 |
| F667Y | ddTTP | 6 | -1.01 | 0.56 | 0.996 |
| | ddCTP | 4 | -1.44 | 0.32 | 0.996 |
| 平均値: | | | | | |
| T7 DNA | 4 ddNTP | | | 2.3 | .924 |
| ポリメラーゼ | | | | | |
| 大腸菌DNA | 4 ddNTP | | | 0.64 | .999 |
| ポリメラーゼ I | | | | | |
| F762Y | | | | | |
| Taq DNA | 4 ddNTP | | | 0.48 | .996 |
| ポリメラーゼ | | | | | |
| F667Y | | | | | |

要約すると、T7 DNAポリメラーゼはddNTPを平均で2.3倍判別しており、一方、大腸菌DNAポリメラーゼI F762YおよびTaq DNAポリメラーゼF667Yは実際に各々平均で1.6倍(1/0.64)および2.1倍(1/0.48) dNTPよりもddNTPを好んでいる。R²の比較は、T7 DNAポリメラーゼよりも大腸菌DNAポリメラーゼI F762YおよびTaq DNAポリメラーゼF667Yで隣接する断片の強度がより均一であることを示している。均一度のより正確な測定には、各々の位置での強度の減衰を減少させるように各々の反応でddNTPを減少させることにより(例えば5倍)、分析に多数の断片を含ませることができる(実施例13参照)。

【0131】新規のDNAポリメラーゼによるddNTPに対する判別の量を決定するためには上に記載した反応と類似の反応が実施されるであろうし、T7 DNAポリメラーゼ(SEQUENASE Version 2.0, United States Biochemical Corporation)を用いて平行して同一の反応が実施され、すべての反応が同一のゲルで分析される。新しいDNAポリメラーゼで得られたジデオキシ停止バンドの分布をT7 DNAポリメラーゼで得られたものと最初に比較することにより、新しいDNAポリメ

* 度の変異性、または特定のジデオキシヌクレオチドを取り込むDNAポリメラーゼの能力の配列特異の変異性を評価するものである。

【0130】

【表7】

| ポリメラーゼ | ddNTP | N | M | D | R2 |
|----------|---------|---|--------|------|-------|
| T7 DNA | ddGTP | 8 | -0.375 | 2.2 | 0.813 |
| ポリメラーゼ | ddATP | 6 | -0.356 | 2.3 | 0.996 |
| | ddTTP | 5 | -0.450 | 1.8 | 0.997 |
| | ddCTP | 8 | -0.317 | 2.7 | 0.889 |
| 大腸菌DNA | ddGTP | 5 | -1.03 | 0.56 | 0.999 |
| ポリメラーゼ I | ddATP | 5 | -0.860 | 0.72 | 0.998 |
| F762Y | ddTTP | 5 | -1.06 | 0.54 | 1.000 |
| | ddCTP | 6 | -0.842 | 0.75 | 1.000 |
| Taq DNA | ddGTP | 5 | -1.18 | 0.45 | 0.995 |
| ポリメラーゼ | ddATP | 6 | -0.997 | 0.59 | 0.997 |
| F667Y | ddTTP | 6 | -1.01 | 0.56 | 0.996 |
| | ddCTP | 4 | -1.44 | 0.32 | 0.996 |
| 平均値: | | | | | |
| T7 DNA | 4 ddNTP | | | 2.3 | .924 |
| ポリメラーゼ | | | | | |
| 大腸菌DNA | 4 ddNTP | | | 0.64 | .999 |
| ポリメラーゼ I | | | | | |
| F762Y | | | | | |
| Taq DNA | 4 ddNTP | | | 0.48 | .996 |
| ポリメラーゼ | | | | | |
| F667Y | | | | | |

※一ゼがT7 DNAポリメラーゼより多くまたは少なくddNTPを判別するかが示されるであろう。例えば、大腸菌DNAポリメラーゼI F762Yを用いたそのような視覚的評価は、4 ddNTPの各々との反応に対し、大腸菌DNAポリメラーゼI F762Yを用いた反応でのゲル上に見ることができる断片の数がT7 DNAポリメラーゼを用いたものより少ない(および平均の大きさが小さい)ことを示している。上記のように新しいDNAポリメラーゼの指数関数的減衰因子(M)、dNTPと相対的なddNTPの利用の平均相対速度(D)、および強度の変異性(R²)を計算するために前に記載した分析法に類似のより定量的な分析が実施できるであろう。

【0132】本試験で起こり得る複雑な問題は、Taq DNAポリメラーゼに付随する5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性および大腸菌DNAポリメラーゼIおよび天然のT7 DNAポリメラーゼ(上記の実験で使用された28T7 DNAポリメラーゼ欠損突然変異体ではない)に付随する3'から5'へのエキソヌクレアーゼ活性のようにDNAポリメラーゼが付随するエキソヌクレアーゼ活性を持っている場合である。5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性はプライマーの5'末端上の標識物

を除去でき検出される放射活性信号を減少させるので有害である。この問題は反応混合物中のDNAポリメラーゼの量を減少させることにより部分的に避けることができる。前の実施例において、0.025単位のTaq DNAポリメラーゼでは5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性による明かな放射活性の損失無しに事実上すべてのプライマーがジデオキシヌクレオチドの取り込みにより停止されるまで伸長されているが、一方Taq DNAポリメラーゼ活性を40倍増加させると（または反応当たり1単位）、プライマーの5'末端から事実上すべての³²Pが失われている。5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性を持つDNAポリメラーゼの判別の程度を測定する別の方法は実施例8-10に記載されたような異なるアッセイを使用することである。

【0133】3'から5'へのエキソヌクレアーゼ活性はDNAポリメラーゼが実際に行うより以上にddNTPを判別するようにするため、上記のアッセイを複雑化させる（例えば、TaborおよびRichardson, 86 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 4076, 1987参照）。これは一度ジデオキシヌクレオチドが取り込まれても、このエキソヌクレアーゼ活性は優先的にジデオキシヌクレオチドを除去できるのでDNA合成を続けることができその結果、断片の長さが増加することになる。好適には、上記の試験でアッセイされる酵素ではそのような3'から5'へのエキソヌクレアーゼ活性は失われている；修飾されたT7 DNAポリメラーゼ（SEQUENASE, United States Biochemical Corporation）、Taq DNAポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼ欠損Vent（*Thermococcus litoralis*）DNAポリメラーゼ（New England Biolabsカタログ番号257）、エキソヌクレアーゼ欠損Deep Vent（*Pyrococcus* GB-1）DNAポリメラーゼ（New England Biolabsカタログ番号259）、エキソヌクレアーゼ欠損Pfu（*Pyrococcus furiosus*）DNAポリメラーゼ（Stratageneカタログ番号600163）およびエキソヌクレアーゼ欠損クレノー断片（大腸菌DNAポリメラーゼI, United States Biochemical Corporationカタログ番号70057）がその例である。大腸菌DNAポリメラーゼI（クレノー断片）などのいくつかの例では3'から5'へのエキソヌクレアーゼ活性は弱く、本アッセイを有意に妨害しない（TaborおよびRichardson 264 *J. Biol. Chem.* 6447, 1989）。試験される新規DNAポリメラーゼがddNTPの判別の正確な測定を妨害する3'から5'へのエキソヌクレアーゼ活性を持っているかどうかを決定する一つの方法は、60分までの異なる時点で試料の一部を採取して上記の実験を実施することである。もし、ジデオキシ停止断片の大きさの分布が時間とともに増加したら、そのような3'から5'へのエキソヌクレアーゼ活性がアッセイを妨害しているようであるし、もし断片の分布が時間で一定ならば、そのよう

な活性は有意な影響を与えていない。もし平均断片長が時間とともに増加したら、より短いインキュベーション時間を使用し、および／または時間がたっても断片の大きさが一定に留まるような範囲までDNAポリメラーゼの濃度を減少させなければならない。

【0134】加ピロリン酸分解またはポリメラーゼの逆の反応は3'から5'へのエキソヌクレアーゼ活性と同様の効果を持つことができ、DNAポリメラーゼから鎖停止ジデオキシヌクレオチドを除き断片の長さをさらに増加させる（TaborおよびRichardson 265 *J. Biol. Chem.* 8322, 1990参照）。この活性はDNA合成の間に蓄積されおよび加ピロリン酸分解に必要な基質であるピロリン酸を除くために反応混合物中にピロホフターゼを含ませることにより容易に避けることができる。

【0135】実施例7. ddNTPに対するddNTPの比を変化させることによるデオキシヌクレオチドと比較したジデオキシヌクレオチドの取り込み速度のゲル電気泳動による決定

この実施例は実施例6に記載したものと類似している。ジデオキシヌクレオチドの取り込みを強く判別するDNAポリメラーゼ（例えば、T7 DNAポリメラーゼY526F、大腸菌DNAポリメラーゼIおよびTaq DNAポリメラーゼ）に好適な試験法であるが、効率的にddNTPを取り込むDNAポリメラーゼ（例えば、T7 DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼI突然変異体F762YおよびTaq DNAポリメラーゼF667Y）についてもうまく適用できる。本試験においては二つの異なるDNAポリメラーゼ調製試料に対しddNTPとddNTPの比が変えられ（反応の他の態様はすべて同一に保ちながら）、試験される二つのDNAポリメラーゼにおいて同じような平均長の断片を得るのに必要とされる比を決定するためにジデオキシ停止放射活性標識化断片の分布が比較される。

【0136】一連の断片の平均の長さは二つの方法の内の一つにより決定される。第一はddNMPを効率よく取り込むDNAポリメラーゼに最適なものであり、一つのDNAポリメラーゼを用い、ddNTP:dNTPの比を2倍ずつ変化させた一連の反応物を暴露させたオートラジオグラムを評価して観察できる最も大きな断片の位置を決定し、第二のDNAポリメラーゼを用いた類似の一連のものと比較して、二つのDNAポリメラーゼに関して同じような大きさの断片を発生するために必要な比を決定する。可視できる放射活性バンドの外観を印付ける第一線の位置は通常比較的シャープであり、容易に目で観察される。しかしながら、ホスホイメジャーを用い、ゲルの先端から出発してゲルの下の方へ移動させ、単位面積当たりあるしきい値の放射活性が存在する各々のレーン中の位置を探し出すことによりそのような位置をより正確に決定することも可能である。

【0137】いくつかのDNAポリメラーゼはジデオキ

シヌクレオチドの取り込みを非常に強く判別するので、そのような場合は変性ポリアクリルアミドゲル上の最も大きいジデオキシ停止断片の位置を明瞭に検出できるほど十分な $dNTP$ を反応液に加えるのが困難である。そのようなDNAポリメラーゼに対しては、異なる系列中のジデオキシ停止断片の長さを比較するためにアルカリ性アガロースゲル電気泳動を使用することができる。もし変性ポリアクリルアミドゲルを用いるなら、次に同じような平均長のジデオキシ停止断片の発生させるために必要とされる二つのDNAポリメラーゼの $dNTP$: $dNTP$ の比を決定する別の方法は、一つまたはいくつかのバンドに焦点を合わせ試験されている二つのDNAポリメラーゼに対しこれらの断片の放射活性の特定のレベルを得るのに必要な $dNTP$ と $dNTP$ の比をホスホイメージャーにより分析して決定する。

【0138】これらの試験は実施例6に記載した六つのDNAポリメラーゼを用いて実施された。反応条件は $dNTP$ および $dNTP$ の濃度を除いて実施例6に記載した条件と同一である。すべての反応混合物は $10\mu l$ の $4dNTP$ を含む。四つの $dNTP$ の各々の濃度は六つのDNAポリメラーゼに対して以下の範囲で2倍ずつ変化させた：T7 DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼI F762YおよびTaq DNAポリメラーゼF667Y、 $0.02\mu M$ から $1\mu M$ 、およびT7 DNAポリメラーゼY526F、大腸菌DNAポリメラーゼIおよびTaq DNAポリメラーゼ100から2,000 μM 。実施例6に記載したごとく反応が実施され、試料は変性ポリアクリルアミドゲルにより分析された。ゲルの乾燥、オートラジオグラフィーおよびホスホイメージャーは実施例6に記載した通りである。下記の表はこの実験の結果を要約している；T7 DNAポリメラー

ポリメラーゼ

取り込み速度比

| | dG/ddG | dA/ddA | dT/ddT | dC/ddC |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|
| T7 DNA ポリメラーゼ | 3.2 | 3.3 | 2.8 | 3.7 |
| T7 DNA ポリメラーゼY526F | 6,400 | 7,300 | 8,400 | 11,000 |
| 大腸菌 DNA ポリメラーゼ I | 140 | 720 | 1,100 | 250 |
| 大腸菌 DNA ポリメラーゼ I F762Y | 0.56 | 0.72 | 0.54 | 0.75 |
| Taq DNA ポリメラーゼ | 1,400 | 4,700 | 4,500 | 2,600 |
| Taq DNA ポリメラーゼF667Y | 0.45 | 0.59 | 0.56 | 0.32 |

下記の表は $dNTP$ の代わりに $dNTP$ を使用することに対して、T7 DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼIおよびTaq DNAポリメラーゼの決定的選択性残基のフェニルアラニンの代わりにチロシン ※

残基

平均速度

* ぜ、大腸菌DNAポリメラーゼI F762YおよびTaq DNAポリメラーゼF667Yに示されている値は $dNTP$ と $dNTP$ を1:1の比で使用して得られたジデオキシ停止断片の強度の指数関数的減衰の速度の統計的分析により実施例6で得られた絶対比である。T7 DNAポリメラーゼY526F、大腸菌DNAポリメラーゼIおよびTaq DNAポリメラーゼF667Yを用いて発生させた系列と同じような平均長のジデオキシ停止断片の系列を発生させるのに必要とされる $dNTP$ と $dNTP$ の比を決定することにより得られた；すなわち、野生型および突然変異体DNAポリメラーゼの各々の組に対しジデオキシ停止断片の同じような分布を与える $dNTP$: $dNTP$ 比が決定された。強く判別する酵素（すなわち、決定的位置にフェニルアラニンを含むもの）との反応で使用される $dNTP$: $dNTP$ 比を比較的非判別的な酵素（すなわち、決定的位置にチロシンを含むもの）でジデオキシ停止断片の同じような分布を得るために使用された $dNTP$: $dNTP$ 比で割ると、同じような $dNTP$ の代わりに $dNTP$ が使用されることにおける二つのDNAポリメラーゼ間の効率の相違に対応する因子を与える。この因子は以下にT7 DNAポリメラーゼY526F、大腸菌DNAポリメラーゼIおよびTaq DNAポリメラーゼのために示された値を得るために各々T7 DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼI F762YおよびTaq DNAポリメラーゼF667Yで得られた絶対比が乗ぜられる。

【0139】

【表8】

※に変えたことの影響を要約している。

【0140】

【表9】

dN/dN $dNTP$ の使用

| | | の改良 | |
|----------|---------------|--------|---------|
| T7 DNA | チロシン (WT) | 3. 0 | 3, 000X |
| ポリメラーゼ | フェニルアラニン | 8, 000 | |
| 大腸菌DNA | フェニルアラニン (WT) | 600 | |
| ポリメラーゼ I | チロシン | 0. 6 | 1, 000X |
| Taq DNA | フェニルアラニン (WT) | 3. 000 | |
| ポリメラーゼ | チロシン | 0. 5 | 6. 000X |

新規のDNAポリメラーゼの判別の程度の決定のためにこの試験を使うには、最初に広い範囲のddNTPとdNTPの比を用いて上記の反応が実施され、変性ポリアクリルアミドゲル上のジデオキシ停止断片の分布が標準（例えばT7 DNAポリメラーゼ）のものと比較されるであろう。同じような平均の長さのDNA断片を持つレーンと釣り合わせ、新規DNAポリメラーゼのddNTP:dNTP比をT7 DNAポリメラーゼで使われた比で割るとT7 DNAポリメラーゼと相対的な新規DNAポリメラーゼによるddNTPに対する判別の程度が得られる。

【0141】DNAポリメラーゼの修飾がddNTPを判別する能力を減少させた（すなわち、ジデオキシヌクレオチドをより効率よく取り込む）かどうかを決定するために本試験を使用するには、同一の単位数の修飾および非修飾DNAポリメラーゼが上記のddNTPとdNTPをの種々の比で含む一連の反応で使用されるであろう。二つの酵素に対しddNTPとdNTPが同一の比でジデオキシ停止断片の平均の長さが比較される。もし修飾がDNAポリメラーゼがジデオキシヌクレオチドをより効率よく取り込む結果を与えるなら、dNTP対ddNTPが同じ比では非修飾DNAポリメラーゼを使用した反応のジデオキシ停止断片の平均の長さに比較して修飾DNAポリメラーゼを使用したものの方がより短いであろうし、一方、もし修飾によりDNAポリメラーゼがddNTPをより判別するようになるなら修飾DNAポリメラーゼを用いた反応で平均の長さがより長くなるであろう。

【0142】この試験はDNAポリメラーゼの修飾で *

| ダイデオキシターミネーター | 比 |
|---------------|--------|
| G ターミネーター | >400 |
| A ターミネーター | >2,000 |
| T ターミネーター | >2,000 |
| C ターミネーター | >2,000 |

前に議論したように、使用しているDNAポリメラーゼが付随するエキソヌクレアーゼ活性を持っている場合、この試験の使用において一つの複雑な問題が生じる。5'から3'へのおよび3'から5'へのエキソヌクレアーゼが起こす問題、およびそれらの影響を最小にする方法は実施例6に議論されている。ポリメラーゼの修飾がジデオキシヌクレオチドを取り込むその能力を減少させるかどうかを決定するための試験を行う場合、この効果を持つこ

* dNTP類似体（例えば、蛍光標識を付けたddNTP

10 P）を判別する能力が減少したかどうかを決定するためにも使用できる。この試験は試験されている類似体の濃度が解っていないなくても可能である。この例として四つのダイデオキシターミネーター（DyeDeoxy Terminators、Applied Biosystemsにより製造されている、部品番号401150）の各々の使用におけるTaq DNAポリメラーゼおよびTaq DNAポリメラーゼF667Yの能力を比較した。これらのダイデオキシターミネーターは四つのddNTPの各々に共有結合で結合された四つの異なる蛍光発色団を持っている（より詳細には実施例12参照）。四つのダイデオキシターミネーターの各々に対し、ダイデオキシターミネーターに対するdNTPの比を2倍づつ16000倍の範囲に渡って変化させ、ジデオキシ停止断片の同一の平均の長さが得られる二つの酵素の各々に必要とされる比を決定するためオートラジオグラムのジデオキシ停止断片のパターンを比較する。下記の表はこれらの結果を要約している。各々のターミネーターにおいて”比”と記されている欄は、Taq DNAポリメラーゼ対Taq DNAポリメラーゼF667Yで同一の平均の長さの断片を与えるのに必要とされるdNTPに対するddNTPの比を表している。通常のddNTPのごとく、Taq DNAポリメラーゼF667Yは非修飾Taq DNAポリメラーゼが行うよりもより効率的に（少なくとも400倍）蛍光ddNTP誘導体を取り込む。

【0143】

【表10】

※とができる一組の突然変異体は正常では非常に活性な3'から5'へのエキソヌクレアーゼ活性を不活性にするものである（例えば、TaborRichardson 84, Proc. Natl. Acad. Sci. 4767, 1987参照）。この突然変異体の組は本特許では特許請求されていない。もしジデオキシヌクレオチドを取り込むDNAポリメラーゼの能力の明かな増強を与える修飾DNAポリメラーゼを持っているならば、それがポリメラーゼ領域にあるかまたはエキソヌクレアーゼ

領域にあるかを決定することが望まれ、それは酵素の修飾型および非修飾型でエキソヌクレアーゼアッセイを実施することが必要である；酵素のエキソヌクレアーゼ活性に基本的に影響を及ぼす突然変異は酵素のポリメラーゼ活性よりもエキソヌクレアーゼ活性により大きな影響を与えるであろう。好適には、 ^{32}P -ddAMPで3'末端が標識されたDNA基質でエキソヌクレアーゼ活性が測定されるであろう（実施例21参照）。実施例6のように、DNAポリメラーゼによる見かけのddNTP判別増加を避けるため、これらの反応における加ピロリン酸分解を阻害することが重要である。これは反応にピロホスファターゼを含ませることにより容易に達成される。

【0144】実施例8. 一本鎖M13 DNA-非標識40-merプライマー複合体上のDNA合成の阻害によるジデオキシヌクレオチドの取り込み効率の決定

本実施例においてはddNTPに対するDNAポリメラーゼの感度が標準DNA合成反応を阻害する種々の濃度でのddNTPの能力を測定することにより決定された。DNA合成アッセイはTaborおよびRichardson 264 *J. Biol. Chem.* 6447, 1989に記載されている方法を改良したものである。40-merプライマーおよびM13 mGP1-2テンプレートは実施例3に記載した通りである。2μgのM13 mGP1-2 DNA、6ピコモルのプライマー（テンプレートに対し10倍モル過剰）、40mM トリスHCl, pH8.0、10mM MgCl₂、100mM NaClを含む反応混合物中で（1X=25μl）プライマーがM13 mGP1-2一本鎖DNAテンプレートにアニールされた。混合物は65℃で2分間インキュベートした後30分以上かけて室温まで冷却した。標準反応混合物（45μl）は22mM トリスHCl, pH8.0、5.5mM MgCl₂、55mM NaCl、300μM dGTP、dATP、dCTPおよび ^3H TTP（30cpm/pmol）、および四つのddNTPの一つまたは四つのddNTPすべてを含む。反応混合物はまた、DNAポリメラーゼによる見かけの判別の増加を起こす加ピロリン酸分解を阻害するために10ngの酵母無機ピロホスファターゼも含む（TaborおよびRichardson 265 *J. Biol. Chem.* 8322, 1990）。混合物は37℃で1分間（好熱性DNAポリメラーゼでは70℃）イ

ポリメラーゼ

| | | |
|---------|--------|--------|
| T7 DNA | ポリメラーゼ | |
| T7 DNA | ポリメラーゼ | Y526F |
| 大腸菌DNA | ポリメラーゼ | I |
| 大腸菌DNA | ポリメラーゼ | IF762Y |
| Taq DNA | ポリメラーゼ | |
| Taq DNA | ポリメラーゼ | F667Y |

この試験は新規DNAポリメラーゼの修飾がddNTPを判別する能力を減少させるかどうかを決定するために使用できる；もし突然変異がこの効果を示さないならば、上記のアッセイ中のDNA合成の50%阻害に4d

* インキュベートし、20mM トリスHCl, pH7.5、10mM 2-メルカプトエタノールおよび0.05%ウシ血清アルブミンに希釈した試験DNAポリメラーゼの希釈液（0.01から1単位）の5μlを添加することにより反応を開始させた。反応混合物はさらに37℃で10分間（好熱性DNAポリメラーゼでは70℃）インキュベートする。5μlの100mM EDTAの添加により反応を停止させ、45μlをWhatman DE81フィルターディスク上へスポットする。ディスクは150mlの0.3Mギ酸アンモニウム（pH8.0）で4回、続いて100mMの90%エタノールで2回洗浄する（各々5-10分）。次にディスクをランプ下で乾燥させ、5mlのfluor（Opti-Fluor 0, Packard）存在下シンチレーションカウンターで計数する。各々のディスク上の放射性の量から全DNA合成量を計算する。

【0145】試験される特定のDNAポリメラーゼは上に示唆した以外の最適の緩衝液、pH、塩または温度条件を持っているであろう。各々のDNAポリメラーゼはその酵素に最適の特異的ポリメラーゼ活性を与える条件下で試験されなければならない。

【0146】DNAポリメラーゼの修飾がジデオキシヌクレオチドを判別する能力を減少させるかどうかを決定するには、最初にddNTP非存在下、酵素の修飾および非修飾型の両方で活性が酵素濃度とほとんど直線的に変化するような範囲を決定するためDNAポリメラーゼ濃度を変化させて一連の反応が実施される。酵素濃度は酵素の両方の形に対しこの直線範囲にあるように選択される；例えば、約30%のテンプレートが10分で複製されるような酵素濃度はそのような直線範囲に入っているであろう。

【0147】適当な酵素濃度が選択されたら、DNA合成の50%を阻害するのに必要とされる濃度を決定するために一つのddNTPまたは好適には四つすべてのddNTPの量を変化させて一連の反応を実施する。例えば上記の条件下（300μM、4ddNTP）、下記の濃度の4ddNTPの混合物が下記の六つのDNAポリメラーゼに対してのDNA合成の50%阻害に必要とされた。

【0148】

【表11】

【4ddNTP】 50%阻害

| |
|--------|
| 0.1μM |
| 300μM |
| 20μM |
| 0.04μM |
| 150μM |
| 0.4μM |

※ ddNTPのより高い濃度が必要とされるであろう。

【0149】実施例9. 合成プライマー-テンプレート複合体への ^{32}P ddAMP取り込みの測定によるジデオキシヌクレオチド取り込み効率の決定

この実施例においては合成プライマーテンプレート内の一つの部位での取り込みによりdNTPおよびddNTP間の競合がアッセイされる。このアッセイは判別における配列特異的変異による複雑化を避けるため、一つの部位への二つの基質の取り込みの比較に制限するという点で他のアッセイと異なる。この比較的単純なアッセイはDNAポリメラーゼのddNTP判別能力の予備的なスクリーニングに適しているが、ddNTPの判別はしばしばDNA配列分析における重要な問題である隣接する配列による影響を強く受けるので(例えば、Tabor

プライマーテンプレート A:

5' GGCGACGTTGTAAAACGACGCCAGTGCCA 3'
3' GCTGCAACATTTTGCTGCCGGTCACGGTCCCC 5'

プライマーテンプレート B:

5' GGCGACGTTGTAAAACGACGCCAGTGCCA 3'
3' GCTGCAACATTTTGCTGCCGGTCACGGTCAGTTTT 5'

各々の反応混合物は各々25ピコモルのプライマーおよびテンプレートを含む。プライマーおよびテンプレートは一緒に混合され40mMトリスHCl, pH8.0, 10mM MgCl₂, 100mM NaClを含む反応混合物中で(IX=10μl)アニール化された。混合物は65℃で2分間インキュベートし、30分以上かけて室温まで冷却した。プライマーテンプレートAで反応を実施するための標準反応混合物(45μl)は22mMトリスHCl, pH8.0, 5.5mM MgCl₂, 55mM NaCl, 25ピコモルのプライマーテンプレートA複合体, 5μM [α-³²P] dGTP (4,000cpm/ピコモル) および濃度を変化させたdATPおよびddATPを含む。反応混合物はまた、DNAポリメラーゼによる見かけの判別の増加を起こす加ピロリン酸分解を阻害するために10ngの酵母無機ピロホスファターゼも含む(TaborおよびRichardson 265 J. Biol. Chem. 8322, 1990)。混合物は37℃で1分間(好熱性DNAポリメラーゼでは70℃)インキュベートし、20mMトリスHCl, pH7.5, 10mM 2-メルカプトエタノールおよび0.05%ウシ血清アルブミンに希釈した試験DNAポリメラーゼの希釈液(0.01から1単位)の5μlを添加することにより反応を開始させた。反応混合物はさらに37℃で10分間(好熱性DNAポリメラーゼでは70℃)インキュベートする。5μlの100mMEDTAの添加により反応を停止させ、45μlをWhatman DE81フィルターディスク上へスポットする。ディスクは150mlの0.3Mギ酸アンモニウム(pH8.0)で4回、続いて100mMの90%エタノールで2回洗浄する(各々5-10分)。次にディスクをランプ下で乾燥させ、5mlのfluor (Opti-Fluor O, Packard) 存在下シンチレーションカウンターで計数する。各々のディスク上の放射活性の量から取り込まれた ※

ポリメラーゼ

T7 DNA ポリメラーゼ

T7 DNA ポリメラーゼ Y526F

大腸菌DNA ポリメラーゼ I

* およびRichardson 265 J. Biol. Chem. 8322, 1990参

照)、実施例6-8に示されたアッセイの排除に使用されるべきではない。

【0150】次に示した二つのプライマーテンプレートがこの実施例で用いられた。最初のものはdATP対ddATP間の判別の決定に使用され;一方、第二のものはdCTP対ddCTP、dTTP対ddTTPおよびdGTP対ddGTP間の判別の決定に使用される。

【0151】

【表12】

※ [³²P] dGMP量が決定された。一度一つのdAMP残基が取り込まれたらdGMP残基の取り込みのための阻害が取り除かれ、四つの[³²P] dGMPが各々のプライマーに取り込まれるであろうことが仮定され、従って取り込まれたdAMPの数は取り込まれたdGMPの数の4分の1である。

【0152】すべての反応は分析するDNAポリメラーゼを一定の量にして実施される;DNAポリメラーゼの量は10μMのdATP存在下およびddATP非存在下での10分のインキュベーションによりテンプレートの一本鎖領域中の全dCMP残基の50%を複製するのに十分な量でなければならない。試験される特定のDNAポリメラーゼは上に示唆した条件と異なる最適の緩衝液、pH、塩または温度条件をもっているであろう。各々のDNAポリメラーゼはその酵素に最適な特定のポリメラーゼ活性を与える条件下で試験されなければならない。対照反応もdATPおよびddATP非存在下で実施されなければならない;これにより各々の試料から差し引かれるバックグラウンドDNA合成が決められる。これは一般にdATP存在下で得られるDNA合成の10%未満である。

【0153】DNA合成を50%阻害するのに必要とされるddATP量を決定するため、10μM dATPおよび種々の濃度のddATPで反応が実施される。10μM dATP存在下DNA合成を50%阻害するのに必要とされるddATP濃度の例が下記の表に示されている。ポリメラーゼは実施例6に記載した通りである。

【0154】

【表13】

[ddATP] 50%阻害

~30μM

>500μM

>500μM

61

大腸菌DNA ポリメラーゼ I F 7 6 2 Y
T a q DNA ポリメラーゼ
T a q DNA ポリメラーゼ F 6 6 7 Y

d d G T P、d d T T Pまたはd d C T Pの判別を測定するための類似の試験を実施するには、上記の反応と同一の反応が実施されるが、ただしプライマー-テンプレートAの代わりにプライマー-テンプレートBが使用され、反応液は10 μ Mのd G T P、d T T Pおよびd C T Pおよび5 μ Mの[$a-^{32}$ P] d A T P (4,000cpm/ピコモル) および濃度を変化させたd d G T P、d d T T Pまたはd d C T Pを含む。

【0155】他の実施例同様に、3'から5'へのエキソヌクレアーゼ活性を持つDNAポリメラーゼはこのアッセイを妨害し、類似体の取り込みレベルでの判別によるものよりも酵素のd d N T Pに対する判別性を高める。さらに、高レベルのエキソヌクレアーゼ活性を持つ酵素は反応混合物中のすべてのd N T Pを消費してしまい(特に、これらの反応において比較的低い濃度でd N T Pが存在する場合) 正味のDNA合成が起こらなくなる(例えば、天然のT7 DNAポリメラーゼ、TaborおよびRichardson 264 J. Biol. Chem. 6447, 1989参照)。これらの場合においてDNAポリメラーゼの濃度および反応のインキュベーション時間はd d N T P非存在下でのDN

プライマー-テンプレート A:

5' GCGACGTTGTAAAAACGACGGCCAGTGCCA 3'
3' GCTGCAACATTTTGTGCGCGTCACGGTTCCCC 5'

[$a-^{32}$ P] d d G M P、[$a-^{32}$ P] d d C M Pおよび[$a-^{32}$ P] d d T M Pの取り込みも同様に適当なテンプレート(例えば、実施例9のプライマー-テンプレートB)で試験できる。

【0158】各々の反応混合物は各々25ピコモルのプライマーおよびテンプレートを含む(プライマー-テンプレートA、上記参照)。プライマーおよびテンプレートは一緒に混合され40mMトリスHCl, pH8.0、10mM MgCl₂、100mM NaClを含む反応混合物中で(1X=10 μ l)アニールされた。混合物は65℃で2分間インキュベートし、30分以上かけて室温まで冷却する。標準反応混合物(45 μ l)は22mMトリスHCl, pH8.0、5.5mM MgCl₂、55mM NaCl、25ピコモルのプライマー-テンプレートA複合体、2.5 μ M [$a-^{32}$ P] d d A T P (非標識d d A T Pで4,000cpm/ピコモルの比活性まで希釈されたAmersham PB10235、>5,000Ci/ピコモル)および濃度を変化させたd d A T Pを含む。反応混合物はまた、DNAポリメラーゼによる見かけの判別の増加を起こす加ピロリン酸分解を阻害するために10ngの酵母無機ピロホスファターゼも含む(TaborおよびRichardson 265 J. Biol. Chem. 8322, 1990)。混合物は37℃で1分間(好熱性DNAポリメラーゼでは70℃)インキュベートし、20mMトリスHCl, pH7.5、10mM 2-メルカプトエタノールおよび0.05%ウシ血清アルブミンに希釈

62

~6 μ M
>500 μ M
~5 μ M

* A合成が最大のレベルで得られるように調整されていない。

【0156】実施例10. 合成プライマー-テンプレート複合体への[$a-^{32}$ P] d d N M P取り込み効率の決定

この実施例においては合成プライマー-テンプレート中の一つの部位での取り込みについてd N T Pおよびd d N T P間の競合がアッセイされる。このアッセイは標識が[$a-^{32}$ P] d d A T Pであり、従ってd d A M Pの取り込みが測定されているという点で実施例9と異なる。このアッセイはd d N T Pがプライマーの3'末端内へ取り込まれ鎖停止剤として作用し、または単にDNAポリメラーゼに結合して実際にプライマー内に取り込まれることなく更なるDNA合成を妨害することによりDNAポリメラーゼを阻害するかどうかの試験に使用することができる。

【0157】以下の実施例においてd d A M Pの取り込みは[$a-^{32}$ P] d d A T Pおよびプライマー-テンプレートA(実施例9)を使用して測定される:

【表14】

※した試験DNAポリメラーゼの希釈液の5 μ l (0.01から1単位)を添加することにより反応を開始させた。反応混合物はさらに37℃で10分間(好熱性DNAポリメラーゼでは70℃)インキュベートする。5 μ lの100mM E D T Aの添加により反応を停止させ、45 μ lをWhatman DE81フィルターディスク上へスポットする。ディスクは150mlの0.3Mギ酸アンモニウム(pH8.0)で4回、続いて100mMの90%エタノールで2回洗浄する(各々5-10分)。次にディスクをランプ下で乾燥させ、5mlのfluor (Opti-Fluor 0, Packard) 存在下シンチレーションカウンターで計数する。各々のディスク上の放射活性の量から取り込まれた[32 P] d d A M P量が決定された。

【0159】すべての反応は分析するDNAポリメラーゼを一定の量にして実施される; DNAポリメラーゼの濃度はd A T P非存在下10分間のインキュベーションでプライマー-テンプレートA内への[32 P] d d A M Pの最も高い水準の取り込みを与える濃度でなければならない。試験される特定のDNAポリメラーゼは上に示唆した条件と異なる最適の緩衝液、pH、塩または温度条件をもっているであろう。各々のDNAポリメラーゼはその酵素に最適な特定のポリメラーゼ活性を与える条件下で試験されなければならない。

【0160】d d N T Pの判別レベルの決定にこのアッセイを使用するために、反応は2.5 μ M d A T P存在([

※50

³²P] ddAMPの濃度と当量) または非存在下、一定の量のDNAポリメラーゼおよび ³²P] ddATPで実施され、ddATPの存在が ³²P] ddAMPの取り込みに与えた影響が決定される。もしDNAポリメラーゼがddAMPおよびAMPの取り込みを判別せず、および3'から5'へのエキソヌクレアーゼ活性を持たないとしたら、ddATPの添加は ³²P] ddAMPの取り込みを50%阻害するであろう。

【0161】この試験はTaq DNAポリメラーゼF667YのようにddNMPを効率よく取り込むDNAポリメラーゼに最適である。ddNMPを強く判別するDNAポリメラーゼには、ddNTPをより高い濃度で使用できるので標識がddNTPとの競合に使用されているもの以外のdNTP内にある前記のアッセイが好適である。

【0162】しかしながら、ddNMPを強く判別するDNAポリメラーゼにおいて、もし与えられた突然変異がddNMPに対する判別レベルを減少させているかどうかを試験することに関心がある場合には、ddATP非存在下、この基質で非修飾DNAポリメラーゼをアッセイし (DNAポリメラーゼ濃度の関数として ³²P] ddAMPの取り込みを測定する)、突然変異体酵素の取り込み速度とその取り込み速度を比較することによりこのアッセイが使用できる。もし突然変異がddATPに対する判別を減少させているならば、突然変異体酵素は ³²P] ddAMPの取り込みに対しより高い比活性を持っていないなければならない。

【0163】他の実施例同様に、3'から5'へのエキソヌクレアーゼ活性を持つDNAポリメラーゼはこのアッセイを妨害し、類似体の取り込みレベルでの判別によるものよりも酵素のddNTPに対する判別性を高める。および実施例9のように、高いレベルのエキソヌクレアーゼ活性を持つ酵素はすべてのdNTPを使い果たすことができるので正味の ³²P] ddAMPの取り込みが起らない。これらの場合、試験されているDNAポリメラーゼによる ³²P] ddAMPの取り込みの最大水準が得られるようにDNAポリメラーゼの濃度および反応のインキュベーション時間を調整しなければならない。

【0164】上記のすべての方法は伸長されたプライマーの長さまたはプライマー状のDNA合成量の検出が放射活性に基づくものである。DNAポリメラーゼによるジデオキシヌクレオチドの取り込み効率はまた非放射活性によっても測定できる。Applied Biosystems モデル373A DNAシーケンシングシステムで検出する蛍光プライマーまたは蛍光ダイデオキシターミネーターが使用される二つの実施例が以下に示されている。

【0165】実施例11. 一本鎖DNAにアニールされた蛍光プライマーおよびゲル電気泳動を用いたジデオキシヌクレオチドの取り込み効率の決定

この実施例では蛍光標識プライマーが一本鎖DNAにア

ニールされ、DNA合成反応はddNTPとdNTPの種々の比を用いて実施された。試料は次にApplied Biosystems モデル373A DNAシーケンシングシステムにかけ、各々の蛍光断片の長さはゲル電気泳動の直接蛍光検出により決定された。反応はTaborおよびRichardson 265 *J. Biol. Chem.* 8322, 1990に記載されているように実施された。使用されたプライマーは"Fa m" プライマー (Applied Biosystems) である。使用されたDNAは実施例3に記載したような一本鎖M13mGP1-2である。プライマーは2μgのM13mGP1-2 DNA、5ngのプライマー、40mMトリスHCl, pH8.0、10mM MgCl₂、および100mM NaClを含む反応混合物中で (1X=10μl) M13mGP1-2一本鎖DNAにアニールされた。混合物は65℃で2分間インキュベートし、30分以上かけて室温まで冷却する。標準反応混合物 (18μl) は22mMトリスHCl, pH8.0、5.5mM MgCl₂、55mM NaClおよび濃度を変化させた4dNTPおよび四つのddNTPの内の一つを含む。反応混合物はまた、DNAポリメラーゼによる見かけの判別の増加を起こす加ピロリン酸分解を阻害するために10ngの酵母無機ピロホスファターゼも含む (TaborおよびRichardson 265 *J. Biol. Chem.* 8322, 1990)。混合物は37℃で1分間 (好熱性DNAポリメラーゼでは70℃) インキュベートし、20mMトリスHCl, pH7.5、10mM 2-メルカプトエタノールおよび0.05%ウシ血清アルブミンに希釈した試験DNAポリメラーゼの希釈液の2μl (0.01から1単位) を添加することにより反応を開始させた。反応混合物はさらに37℃で10分間 (好熱性DNAポリメラーゼでは70℃) インキュベートする。反応液に8μlの20mM DTPA、1M酢酸カリウム, pH5.0および60μlのエタノールを加える。遠心分離後、DNAを6μlの80%ホルムアミド、10mMトリスHCl, pH8.0および1mM EDTAに再懸濁し、使用説明書に従ってApplied Biosystems モデル373A DNAシーケンシングシステムにかけ直前に80℃に2分間加熱する。

【0166】試験される特定のDNAポリメラーゼは上に示唆した条件と異なる最適の緩衝液、pH、塩または温度条件をもっているであろう。各々のDNAポリメラーゼはその酵素に最適な特定のポリメラーゼ活性を与える条件下で試験されなければならない。DNAポリメラーゼの濃度は10分間の反応でジデオキシヌクレオチドが取り込まれるまでほとんどのプライマーが少なくとも数百ヌクレオチド伸長されるのに十分なほどでなければならない。

【0167】ddNTPに対するdNTPの比は約300塩基に最適のピーク強度が得られるように調節される。例えば、Taq DNAポリメラーゼに対しては約10μMの4dNTPおよび200-600μMのddNTPが最適であり、一方Taq DNAポリメラーゼF667Yに対しては300μMの4dNTPおよび0.5-5μMのddN

10

20

30

40

50

TPが最適である。

【0168】DNAポリメラーゼの修飾がジデオキシヌクレオチドを判別する能力を減少させているかどうかを決定するには、非修飾および修飾DNAポリメラーゼの両方に対してddNTPに対するdNTPの割合を変化させて反応を実施しなければならず、修飾DNAポリメラーゼが非修飾酵素よりddNTPをより効率的に利用しているかどうかを決定するために異なる長さのジデオキシ停止断片の強度が比較される。

【0169】実施例12. ゲル電気泳動による蛍光ジデオキシヌクレオチドの取り込み効率の決定

この実施例においては非蛍光プライマーが一本鎖DNAにアニールされ、DNA合成反応が単一の蛍光標識ddNTPに種々の割合のdNTPを用いて実施される。試料は次にApplied Biosystems モデル373A DNAシーケンシングシステムにかけ、各々の蛍光断片の長さはゲル電気泳動の直接蛍光検出により決定された。本実施例で使用されたプライマーは実施例3に記載したような40-merであり、テンプレートは実施例3に記載したような一本鎖M13mGP1-2である。プライマーは2μgのM13mGP1-2 DNA、6ピコモルのプライマー（テンプレートの10倍モル過剰）、40mMトリスHCl, pH8.0、10mM MgCl₂、および100mM NaClを含む反応混合物中で(1X=10μl) M13mGP1-2一本鎖DNAテンプレートにアニールされた。混合物は65℃で2分間インキュベートし、30分以上かけて室温まで冷却する。標準反応混合物(18μl)は22mMトリスHCl, pH8.0、5.5mM MgCl₂、55mM NaClおよび濃度を変化させた4dNTPおよび四つの蛍光標識ddNTPの内の一つを含む。四つの蛍光標識ddNTPはApplied Biosystemsからのもので(Taqダイデオキシターミネーターサイクルシーケンシングキット、部品番号401150)、G、A、TまたはC”ダイデオキシターミネーター”と称されている(Taqダイデオキシターミネーターサイクルシーケンシングキットのためのマニュアル、部品番号901497, Rev.E)。反応混合物はまた、DNAポリメラーゼによる見かけの判別の増加を起こす加ピロリン酸分解を阻害するために10ngの酵母無機ピロホスファターゼも含む(TaborおよびRichardson 265 J.Biol.Chem. 8322, 1990)。混合物は37℃で1分間(好熱性DNAポリメラーゼでは70℃)インキュベートし、20mMトリスHCl, pH7.5、10mM 2-メルカプトエタノールおよび0.05%ウシ血清アルブミンに希釈した試験DNAポリメラーゼの希釈液の2μl(0.01から1単位)を添加することにより反応を開始させた。反応混合物はさらに37℃で10分間(好熱性DNAポリメラーゼでは70℃)インキュベートする。反応液に8μlの20mM EDTA、1M酢酸カリウム、pH5.0および60μlのエタノールを加える。遠心分離後、DNAを6μlの80%ホルムアミド、10mMトリスHCl, pH8.0および1mM

DTPAに再懸濁し、使用説明書に従ってApplied Biosystems モデル373A DNAシーケンシングシステムにかけ直前に80℃に2分間加熱する。

【0170】試験される特定のDNAポリメラーゼは上に示唆した条件と異なる最適の緩衝液、pH、塩または温度条件をもっているであろう。各々のDNAポリメラーゼはその酵素に最適な特定のポリメラーゼ活性を与える条件下で試験されなければならない。これらの反応で使用されるDNAポリメラーゼの濃度は10分間の反応でジデオキシヌクレオチドが取り込まれるまでほとんどのプライマーが少なくとも数百ヌクレオチド伸長されるのに十分な濃度でなければならない。Taq DNAポリメラーゼのように5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性を持つDNAポリメラーゼに対しては、断片の5'末端を有意のパーセントで分解するこの活性を避けるためにDNAポリメラーゼの濃度を十分に低く保たなければならない。

【0171】DNAポリメラーゼが蛍光ddNTPを強くまたは弱く判別するかどうかを決定するために、20μMの4dNTPおよび0.01μlのApplied Biosystemsにより提供されている各々のダイデオキシターミネーター

(商品番号401150)を用いて反応が実施された。Taq DNAポリメラーゼがこれらの条件下で使用された場合、蛍光のほとんどはゲルの先端の取り込まれていないダイ-ddNTP中かまたは数百の塩基の長さより大きい断片中にある。対照的に、Taq DNAポリメラーゼF667Yがこれらの条件下で使用された場合、蛍光のほとんどは数百の塩基の長さ未満の断片中にあり、およびゲルの先端の全蛍光の著しく低いパーセントしか取り込まれていないダイ-ddNTPに存在しなかった。

【0172】DNAポリメラーゼの修飾がジデオキシヌクレオチドを判別する能力を減少させているかどうかを決定するには、非修飾および修飾DNAポリメラーゼの両方に対してダイデオキシターミネーターに対するdNTPの割合を変化させて反応が実施され、修飾DNAポリメラーゼが非修飾酵素よりダイデオキシターミネーターをより効率的に使用しているかを決定するために得られた蛍光断片の平均の長さが比較された。

【0173】以下の実施例は異なるDNAポリメラーゼにより合成されたジデオキシ停止断片から作り出されるバンド強度の均一性を試験するために提供されるものである。実施例13. 一本鎖M13DNA-5' ³²P-標識40-mer複合体およびゲル電気泳動を用いるジデオキシヌクレオチド取り込みの均一性の決定

この実施例ではジデオキシヌクレオチド取り込みの均一性が一本鎖M13DNAテンプレートで伸長された5' ³²P-末端標識プライマーで測定される。三つの活性がジデオキシ停止断片のバンド強度の変異を起こすことができる。一つはエキソヌクレアーゼ活性であり、いくつかの配列では優先的である；これは化学的または遺伝学

的手段により選択的に活性を除去することにより避けられる(例えば、TaborおよびRichardson 264 *J. Biol. Chem.* 6447, 1989参照)。第二は加ピロリン酸分解であり; これはDNA合成の間に蓄積され、加ピロリン酸分解に必要な基質であるピロリン酸を分解するピロホスファターゼを反応混合物中に含ませることにより容易に避けることができる。第三はジデオキシヌクレオチドの取り込みにおける配列特異的変異である。バンド強度の変異はDNA配列分析に有害であり、決定されるDNA配列の正確性を減少させる。この試験はジデオキシヌクレオチドをより効率的に取り込むであろう突然変異体DNAポリメラーゼを含む異なるDNAポリメラーゼにより合成された断片中のバンド強度の変異性の程度を比較するために計画された。

【0174】プライマー、テンプレートおよび反応条件は実施例6および7に記載したものと同一である。テンプレートは実施例3に記載されているM13 mGP1-2一本鎖DNAであり、プライマーはまた実施例3に記載されている40-merである。使用された反応条件は、緩衝液、pH、塩および反応温度に関して試験されるDNAポリメラーゼに最適な条件である。マグネシウムが反応混合物中に存在する唯一の金属イオンであることが好適である(すなわち、反応はマンガンを追加せずに実施される)。DNAポリメラーゼの濃度はプライマーのほとんどが10分の反応で伸長され、ジデオキシヌクレオチドの取り込みにより停止されるように選ばれる。ddNTPに対するdNTPの割合は試験される特定のDNAポリメラーゼに対し平均断片サイズが約100-300ヌクレオチドであるように調節される。ddCTPジデオキシヌクレオチドで停止される断片は強度の最も大きな変異を持つ傾向があるので均一性の試験に使用するにはddCTPが好適なddNTPである。

(例えば、TaborおよびRichardson 86 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 4076, 1989参照)。ゲル電気泳動、オートラジオグラフィおよびバンド強度の分析は実施例6に記載したようにゲルのスキャンニングかまたはホスホイメージャー分析による。電気泳動は約55ヌクレオチドの長さの断片がゲルのボトムにつくまで実施される(色素プロモフェノールブルーがゲルのボトムを通り抜け、および色素キシレンシアノールがゲルのボトムから約8cmの所)。

【0175】与えられた一連のddNMP-停止断片(例えば、一連のddCMP-停止断片)に対してはゲルのボトムから最初の20断片が決定された(好適にはホスホイメージャー分析により)。もしくは、最初の20断片の相対的強度を決定するためオートラジオグラムがイメージングデンシトメーターによりスキャンできる。これらの強度は次にその変異性を決定するため実施例6に記載したごとく統計的に分析される。例えば、その値はマッキントッシュプログラムKaleidograph 3.0版

(Synergy Software)によりプロットできる。得られたプロットはKaleidograph ライブラリールーチンの機能を使用して指数関数的減衰曲線に適合される。データの相関指数 R^2 はKaleidograph ライブラリールーチンにより計算される。これはバンド強度の変異の尺度である。新規DNAポリメラーゼを用いて得られた R^2 の値が例えば、マグネシウムまたはマンガン存在下(TaborおよびRichardson 265 *J. Biol. Chem.* 8322, 1990参照)の28T7 DNAポリメラーゼ(Sequenase Version2.0, United States Biochemical Corporation)、大腸菌DNAポリメラーゼ(クレノー断片または突然変異F762Yを持つクレノー断片)またはTaq DNAポリメラーゼ(野生型または突然変異体F667Y)などの既知のDNAポリメラーゼを使用して得られた値と比較される。これらの既知のDNAポリメラーゼで得られた R^2 値は標準値として使用され、それにより新規DNAポリメラーゼの均一性が比較される。

【0176】**実施例14. 一本鎖M13 DNA-非標識プライマーおよびゲル電気泳動を用いた $[a-^{32}P]$ ddNMP取り込みの均一性の決定**

この実施例ではジデオキシヌクレオチド取り込みの均一性が一本鎖M13 DNAテンプレートにアニールされた非標識プライマーを使用し、DNA合成を $[a-^{32}P]$ ddATP存在下で実施して測定される。大腸菌DNAポリメラーゼI、Taq DNAポリメラーゼおよびT7 DNAポリメラーゼY526FのようにddNTPを強く判別する酵素の使用においては必要とされるddNTPの高い濃度を使用しなければならず、ジデオキシヌクレオチド停止断片の均一性の測定には実施例13に記載した試験が好適である。この実施例の試験はT7 DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼIF762YおよびTaq DNAポリメラーゼF667Yのようにジデオキシヌクレオチドを効率よく取り込む酵素での使用には最適である。

【0177】この実施例のプライマー、テンプレートおよび一般的反応は以下の例外を除いて実施例8に記載したものと同一である。テンプレートは実施例3に記載したM13 mGP1-2一本鎖DNAであり、プライマーは同様に実施例3に記載した40-merである。使用される反応条件は緩衝液、pH、塩および反応温度に関して試験されるDNAポリメラーゼに最適のものである。マグネシウムが唯一の金属イオンとして反応混合物に存在することが好適である(すなわち、反応はマンガンを追加せずに実施される)。反応は50 μ MのdGTP、dCTPおよびdTTP、および濃度を変化させたdATPおよび $[a-^{32}P]$ ddATPで実施される。dATPおよび $[a-^{32}P]$ ddATPの濃度は約100ヌクレオチドの長さの断片の放射活性の量が最大になるように選択される。ゲル電気泳動および放射活性断片の分析に関するすべての他の面は実施例13に記載した

通りである。

【0178】実施例15. 一本鎖M13 DNA-蛍光標識プライマー複合体およびゲル電気泳動を用いるジデオキシヌクレオチド取り込みの均一性の決定

この実施例においては、反応は実施例11に記載したごとく実施される。テンプレートは実施例3に記載したM13 mGP1-2一本鎖DNAであり、プライマーは同様に実施例3に記載した40-merである。使用される反応条件は緩衝液、pH、塩および反応温度に関して試験されるDNAポリメラーゼに最適のものである。マグネシウムが唯一の金属イオンとして反応混合物に存在することが好適である（すなわち、反応はマンガンを追加せずに実施される）。DNAポリメラーゼの濃度はプライマーのほとんどが10分の反応で伸長され、およびジデオキシヌクレオチドの取り込みにより停止されるように選択される。ddNTPに対するdNTPの割合は、試験される特定のDNAポリメラーゼに対して平均断片サイズが約100-200ヌクレオチドになるように調節される。ddCTPジデオキシヌクレオチドで停止される断片は強度の最も大きな変異を持つ傾向があるので均一性の試験に使用するにはddCTPが好適なddNTPである。（例えば、TaborおよびRichardson 86 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 4076, 1989参照）。プライマーからの最初の50までのジデオキシ停止断片（約200ヌクレオチド）の強度が決定され、実施例13に記載したごとく統計的に分析された。試験されるDNAポリメラーゼについて相関指数 R^2 が決定され、実施例13に記載されるような既知のDNAポリメラーゼで得られた値と比較される。もしくは、最初の50のバンドの高さが決定され、隣接するバンドの高さの比が計算されて変異性の測定に使用された；試験されるDNAポリメラーゼで実施された反応から得られるこれらの比の最大値および平均値が実施例13に記載したような既知のDNAポリメラーゼを用いて実施した反応から得られた値と比較される。

【0179】実施例16. ゲル電気泳動による蛍光ジデオキシヌクレオチド取り込みの均一性の決定

この実施例においては、反応は実施例12に記載したごとく実施される。特定のDNAポリメラーゼにおいてのダイデオキシターミネーター取り込みの均一性を決定するため、dNTPおよび特定のダイデオキシターミネーターの濃度は平均100-200ヌクレオチド長の蛍光標識断片が得られるように選択された。蛍光の強度はプライマーから10-40の断片で決定された（蛍光標識プライマーに近い最初の10断片は無視された）。断片は実施例13に記載したごとく統計的に分析され、平均変異性が指数関数的減衰曲線に合わせられたデータの相関指数 R^2 が決定された。得られた R^2 の値は実施例13に記載したように既知のDNAポリメラーゼを用いて得られた値と比較される。DNAポリメラーゼ内の特定の

突然変異がより少ない変異性を持つバンドを生成するようなDNAポリメラーゼを与えるかどうかを決定するには、突然変異体DNAポリメラーゼで得られた R^2 値を非修飾DNAポリメラーゼで得られた値と比較する。

【0180】実施例17. 効率よくジデオキシヌクレオチドを取り込むDNAポリメラーゼを使用するDNA配列分析

本発明のDNAポリメラーゼによるDNA配列分析は、電気泳動による分離に適した平均長のジデオキシ停止断片が得られるように調節したddNTPに対するdNTPの割合を用い、標準法で実施された。大腸菌DNAポリメラーゼIの大フラグメント内の突然変異体“クレーン断片F762Y”については、反応は本質的に修飾T7 DNAポリメラーゼと同じように実施され、TaborおよびRichardson 米国特許第4,795,699号、TaborおよびRichardson 86 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 4767, 1987およびSEQUENASEマニュアル“SEQUENASEを用いるDNAシーケンシングのための段階的プロトコール”第3版、United States Biochemical Corporationに記載されている。クレーン断片F762Yは修飾T7 DNAポリメラーゼよりジデオキシヌクレオチドを約5倍効率的に取り込むので、伸長-停止混合物中のddNTP濃度を修飾T7 DNAポリメラーゼで推奨されている標準混合物（Sequenaseマニュアル、上記文献）と比較して5分の1に減少させなければならない。

【0181】Taq DNAポリメラーゼF667Yのような熱安定性DNAポリメラーゼによるDNA配列分析はInnis et al. 85, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9436, 1988により記載されているが、以下の改良を行った。Innisらは1:6 ddGTP:ddGTP、1:32 dATP:ddATP、1:48 dTTP:ddTTPおよび1:16 dCTP:ddCTPのdNTP/ddNTP比を推奨しているが、これらの比は野生型Taq DNAポリメラーゼと比較してTaq DNAポリメラーゼF667Yによる4 ddNTPの使用が3,000-8,000倍より効率的であることを考えにいれて調節しなければならない。したがって、Taq DNAポリメラーゼF667Yによる伸長-停止反応は100 μ Mの4 ddNTPおよび0.1-5 μ Mの四つのddNTPの各々を含まなければならない；ddNTP各々の正確な量はDNA配列の最適な決定のために望ましい平均断片サイズに基づいて調節される。DNAシーケンシング反応のその他の面はおよび変性ゲル電気泳動はInnisら（上記文献）に記載されているとおりである。

【0182】実施例18. ジデオキシヌクレオチドを効率よく取り込む熱安定性DNAポリメラーゼを用いるサイクルDNA配列分析

Taq DNAポリメラーゼF667Yのような熱安定性DNAポリメラーゼによるサイクルDNAシーケンシングはCarothers et al. 7 *BioTechniques* 494, 1987

に記載されているように実施されるが、ただし：(1) 四つのデオキシ/ジデオキシ混合物は250 μ Mの四つすべてのdNTPおよび0.1-10 μ Mの各々のddGTP、ddATP、ddTTPまたはddCTPを含み、各々のddNTPの正確な量はDNA配列の最適な決定のために望ましい平均断片サイズに基づいて経験的に調節される。(2) Taq DNAポリメラーゼの代わりにTaq DNAポリメラーゼF667Yが使用される；Carothers et al. (上記文献)により推奨されているものと同じ単位数のDNAポリメラーゼを使用する。(3) 特定の配列でのDNAポリメラーゼによる見かけの判別を増加させることができる加ピロリン酸分解（バンド強度の均一性を減少させる、TaborおよびRichardson 265 *J. Biol. Chem.* 8322, 1990）を阻害するために反応混合物は10ngの無機ピロホスファターゼを含む。好適にはこのピロホスファターゼは例えばテルムステルモフィラス (*Thermus thermophilus*) (Hohne et al. 47 *Biomed. Biochim. Acta* 941, 1988) のような好熱生物から精製される。

【0183】実施例19. 修飾Taq DNAポリメラーゼおよび蛍光プライマーを用いた自動化サイクルDNAシーケンシング

Taq DNAポリメラーゼF667Yのような熱安定性DNAポリメラーゼおよびApplied Biosystems Dye PrimersによるサイクルDNAシーケンシングはApplied Biosystemsマニュアル（部品番号901482, Rev.B）に記載されている方法の変法である。この方法は以下の変形を除きマニュアルに記載されている方法と同一である：(1) Taq DNAポリメラーゼと比較してTaq DNAポリメラーゼF667YによるddNTPのより効率的な使用を考えにいれてdNTP/ddNTP混合物は変形されなければならない。Applied Biosystemsマニュアルに掲げられている混合物の代わりに使用されるべき新しい混合物は以下のものである：

【表15】dG/ddG混合物=100 μ M c'dGTP, dATP, dTTPおよびdCTP, および0.05 μ M ddGTP
dA/ddA混合物=100 μ M c'dGTP, dATP, dTTPおよびdCTP, および0.3 μ M ddATP
dT/ddT混合物=100 μ M c'dGTP, dATP, dTTPおよびdCTP, および0.25 μ M ddTTP
dC/ddC混合物=100 μ M c'dGTP, dATP, dTTPおよびdCTP, および0.15 μ M ddCTP

ddNTPの濃度は応用に依存して特定のサイズの範囲の断片中の蛍光強度を最大にするように変化させなければならない。例えば、ddNTPの濃度を増加させるとより短い長さの断片の蛍光が増加するであろう。(2) Taq DNAポリメラーゼの代わりにTaq DNAポリメラーゼF667Yが使用される。標準DNAポリメラーゼアッセイ条件下でアッセイされる場合、両方の場合において同一単位数の酵素が使用される。もしくは、同一の数のDNAポリメラーゼ分子が使用できる。

(3) 特定の配列でのDNAポリメラーゼによる見かけの判別を増加させることができる加ピロリン酸分解（バンド強度の均一性を減少させる、TaborおよびRichardson 265 *J. Biol. Chem.* 8322, 1990）を阻害するために反応混合物は10ngの無機ピロホスファターゼを含む。好適にはこのピロホスファターゼは例えばテルムステルモフィラス (*Thermus thermophilus*) (Hohne et al. 47 *Biomed. Biochim. Acta* 941, 1988) のような好熱生物から精製される。本方法のその他のすべての点はApplied Biosystemsマニュアル（上記文献）に記載されている方法と同じである。

【0184】実施例20. 修飾Taq DNAポリメラーゼおよび蛍光色素ターミネーターを用いた自動化サイクルDNAシーケンシング

Taq DNAポリメラーゼF667Yのような熱安定性DNAポリメラーゼおよびApplied Biosystems ダイデオキシターミネーターによるサイクルDNAシーケンシングはApplied Biosystemsマニュアル（部品番号901497, Rev.E）に記載されている方法の変法である。この方法は以下の変形を除きマニュアルに記載されている方法と同一である：(1) マニュアルは各々のシーケンシング反応液（20 μ l反応液）に希釈されていない四つのダイデオキシターミネーターの各々1 μ lの使用を要求している。この実施例において、ターミネーターはTaq DNAポリメラーゼと比較してTaq DNAポリメラーゼF667Yにより数百倍以上効率的に取り込まれるので、ターミネーターはシーケンシング反応混合物への添加に先立って希釈されなければならない。下記の希釈液の各々の1 μ lが1 μ lの非希釈ターミネーター溶液の代わりに各々のシーケンシング反応液に加えられる：

【表16】ダイデオキシ G ターミネーター、H₂Oで500分の1に
ダイデオキシ A ターミネーター、H₂Oで1, 500分の1に
ダイデオキシ T ターミネーター、H₂Oで1, 500分の1に
ダイデオキシ C ターミネーター、H₂Oで1, 000分の1に

これらの希釈は概算である；各々のダイデオキシターミネーターの正確な希釈はプライマーからの決定されるべきDNA配列の塩基の数に依存して経験的に決定されるべきである。(2) Taq DNAポリメラーゼの代わりにTaq DNAポリメラーゼF667Yが使用される。標準DNAポリメラーゼアッセイ条件下でアッセイされる場合、両方の場合において同一単位数の酵素が使用される。もしくは、同一の数のDNAポリメラーゼ分子が使用できる。(3) 特定の配列でのDNAポリメラーゼによる見かけの判別を増加させることができる加ピロリン酸分解（バンド強度の均一性を減少させる、Tabo

rおよびRichardson 265 *J. Biol. Chem.* 8322, 1990) を阻害するために反応混合物は10ngの無機ピロホスファターゼを含む。好適にはこのピロホスファターゼは例えばテルモフィラス (*Thermus thermophilus*) (Hohne et al. 47 *Biomed. Biochim. Acta* 941, 1988) のような好熱生物から精製される。

【0185】この方法は従来の方法よりも500分の1以下しかダイデオキシターミネーターを使用せず、反応完了後に取り込まれなかったダイデオキシターミネーターに付随する問題も少なくなっている。従って、Applied Biosystemsマニュアル (上記文献) に推奨されているように試料をスピニングカラムを通過させ、取り込まれていないダイデオキシターミネーターを除去する必要はない。むしろ、試料はエタノールで沈澱でき、5μlの脱イオン化ホルムアミドおよび1μlの50mM EDTA, pH8.0に溶解し、90℃に2分間加熱し、373A使用説明書に指示に従ってApplied Biosystems 373A DNAシーケンシングシステムにかける。ダイデオキシターミネーターを効率よく取り込むDNAポリメラーゼ (Taq DNAポリメラーゼF667Yのような) ではエタノール沈澱によるDNAシーケンシング反応液の濃縮は必要としない; 好適には高い濃度のプライマーおよびdNTPを用いて実施されるDNAサイクルシーケンシング反応は (下記参照)、等量の脱イオン化ホルムアミドの添加により停止でき、90℃に2分間加熱し、すぐにApplied Biosystems 373A DNAシーケンシングシステムにかけられる。これにより、DNA配列決定の試料を調整する研究者の時間が大幅に節約される。

【0186】上記の方法は比較的低い濃度のdNTPを最初に使用している (7.5μMのdATP、dTTPおよびdCTPおよび37.5μMのdITP)。サイクルDNAシーケンシング反応の間、dNTPが使用されるにつれてdNTPの濃度は減少する。dNTPのこの濃度 (7.5μM未満) はほとんどのDNAポリメラーゼにおける最大のDNAポリメラーゼ活性に最適な濃度より低い濃度である。使用されてきたDNAポリメラーゼはdNTPを強く判別し、dNTPに対して高い割合のdNTPを必要とするので、この低濃度が従来のプロトコールには必要であった。ダイデオキシターミネーター判別性がより弱い本発明のDNAポリメラーゼの使用は、ここでより高い濃度のdNTPの使用を可能にする。例えば上記のプロトコールにおいて、10倍高い濃度のdNTPおよびダイデオキシターミネーターが使用できる; すなわち、75μMのdATP、dTTPおよびdCTPおよび375μMのdITP、および四つのダイデオキシターミネーターの各々の以下の希釈: ダイデオキシ G ターミネーター、H₂Oで50分の1に; ダイデオキシ A ターミネーター、H₂Oで150分の1に; ダイデオキシ Tターミネーター、H₂Oで150分の1に; ダイデオキシ C ターミネーター、H₂O

で100分の1に。このように、この実施例においてはダイデオキシターミネーター濃度は少なくとも50分の1従来のプロトコールの濃度よりも低い。

【0187】実施例21. ³²P] ddAMP停止DNA基質を用いるエキソヌクレアーゼアッセイ

3' ³²P] ddAMP停止DNA基質は、10μgの二本鎖ウシ胸腺DNA、40mMトリスHCl, pH7.5、10mM MgCl₂、5mMジチオスレイトール、50mM NaCl、50μg/mlウシ血清アルブミン、および10単位のHind IIIを含む反応混合物中で天然のウシ胸腺DNAを消化する事により調製した。37℃で60分インキュベーション後、5μlの [α-³²P] d d ATP (Amersham P B10235, >5000Ci/ミリモル) および5単位のSequenase V
10
20
version 2.0 (United States Biochemical Corporation, カタログ番号70775) を加え、混合物を20℃で15分間インキュベートする。反応混合物は等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (24:24:1) で一度抽出し、20mMトリスHCl, pH7.5、2mM EDTA、100mM NaClで平衡化したセファデックス G100 (Pharmacia) の1mlのカラムへのせて分画する。ボイドボリュームで溶出する3' ³²P-標識DNAは全DNAのng当たり約500cpmの比活性を持っている。

【0188】エキソヌクレアーゼアッセイのための反応混合物は (90μl)、40mMトリスHCl, pH7.5、10mM MgCl₂、10mMジチオスレイトール、50mM KClおよび1ミリモルの3' ³²P-標識DNAを含む。反応混合物はまた痕跡量のピロリン酸を除去するために10ngの酵母無機ピロホスファターゼが含まれており、それにより加
30
40
ピロリン酸分解を妨害する (TaborおよびRichardson 265 *J. Biol. Chem.* 8322, 1990)。この混合物を20℃で1分プレインキュベートし、次に10μlの適当な酵素希釈液を添加する。指示された時間37℃でインキュベーションした後、30μlのウシ血清アルブミン (10mg/ml) および30μlのトリクロロ酢酸 (100% w/v) を加えることにより反応を停止する。沈澱したDNAは0℃で15分間インキュベートし、12,000gで30分遠心分離してペレット化する。上清の100μl中の酸可溶性放射活性を測定する。3' ³²P] ddAMP-DNAエキソヌクレアーゼ活性の1単位は15分で1ピコモルの ³²P] ddAMPの酸可溶化を触媒する。

【0189】その他の実施態様も以下の請求の範囲に含まれる。

【0190】

【配列表】

【0191】配列番号: 1

配列の長さ: 14

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

75

76

配列

Arg Arg Ser Ala Lys Ala Ile Asn Phe Gly Leu Ile Tyr Gly

5

10

【0192】配列番号：2

*鎖の数：一本鎖

配列の長さ：14

トポロジー：直線状

配列の型：アミノ酸

*

配列

Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly

5

10

【0193】配列番号：3

※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：14

トポロジー：直線状

配列の型：アミノ酸

※

配列

Arg Asp Asn Ala Lys Thr Phe Ile Tyr Gly Phe Leu Tyr Gly

5

10

【0194】配列番号：4

★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：14

トポロジー：直線状

配列の型：アミノ酸

★

配列

Arg Asp Asn Ala Lys Thr Phe Ile Tyr Gly Phe Leu Tyr Gly

5

10

【0195】配列番号：5

☆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：14

トポロジー：直線状

配列の型：アミノ酸

☆

配列

Arg Arg Ser Ala Lys Ala Ile Asn Phe Gly Leu Ile Tyr Gly

5

10

【0196】配列番号：6

◆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：14

トポロジー：直線状

配列の型：アミノ酸

◆30

配列

Arg Arg Ser Ala Lys Thr Phe Ile Tyr Gly Phe Leu Tyr Gly

5

10

【0197】配列番号：7

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：14

トポロジー：直線状

配列の型：アミノ酸

配列

Arg Asp Asn Ala Lys Ala Ile Asn Phe Gly Phe Leu Tyr Gly

5

10

【0198】配列番号：8

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：14

トポロジー：直線状

配列の型：アミノ酸

配列

Arg Asp Asn Ala Lys Ala Ile Ile Tyr Gly Phe Leu Tyr Gly

5

10

【0199】配列番号：9

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：14

トポロジー：直線状

配列の型：アミノ酸

配列

Arg Asp Asn Ala Lys Thr Phe Asn Phe Gly Phe Leu Tyr Gly

77

78

5

10

【0200】配列番号：10

* 鎖の数：一本鎖

配列の長さ：14

トポロジー：直線状

配列の型：アミノ酸

*

配列

Arg Asp Asn Ala Lys Thr Phe Asn Tyr Gly Phe Leu Tyr Gly

5

10

【0201】配列番号：11

※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：14

トポロジー：直線状

配列の型：アミノ酸

※10

配列

Arg Asp Asn Ala Lys Thr Phe Ile Phe Gly Phe Leu Tyr Gly

5

10

【0202】配列番号：12

★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：14

トポロジー：直線状

配列の型：アミノ酸

★

配列

Arg Arg Ser Ala Lys Ala Ile Asn Phe Gly Leu Ile Tyr Gly

5

10

【0203】配列番号：13

☆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：14

トポロジー：直線状

配列の型：アミノ酸

☆

配列

Arg Asp Asn Ala Lys Thr Phe Ile Tyr Gly Phe Leu Tyr Gly

5

10

【0204】配列番号：14

◆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：14

トポロジー：直線状

配列の型：アミノ酸

◆

配列

Arg Arg Ser Ala Lys Thr Phe Ile Tyr Gly Leu Ile Tyr Gly

5

10

【0205】配列番号：15

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：14

トポロジー：直線状

配列の型：アミノ酸

配列

Arg Arg Ser Ala Lys Thr Phe Asn Phe Gly Leu Ile Tyr Gly

5

10

【0206】配列番号：16

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：14

トポロジー：直線状

配列の型：アミノ酸

40

配列

Arg Arg Ser Ala Lys Ala Ile Ile Tyr Gly Leu Ile Tyr Gly

5

10

【0207】配列番号：17

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：14

トポロジー：直線状

配列の型：アミノ酸

配列

Arg Arg Ser Ala Lys Ala Ile Ile Phe Gly Leu Ile Tyr Gly

5

10

【0208】配列番号：18

配列の長さ：14

79

80

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

配列

Arg Arg Ser Ala Lys Ala Ile Asn Tyr Gly Leu Ile Tyr Gly

5

10

【0209】配列番号：19

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

配列

Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly

5

10

【0210】配列番号：20

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

配列

Arg Asp Asn Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly

5

10

【0211】配列番号：21

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

配列

Arg Arg Ala Ala Lys Thr Phe Ile Tyr Gly Phe Leu Tyr Gly

5

10

【0212】配列番号：22

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

配列

Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Ile Tyr Gly Val Leu Tyr Gly

5

10

【0213】配列番号：23

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

配列

Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Ile Phe Gly Val Leu Tyr Gly

5

10

【0214】配列番号：24

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

配列

Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Tyr Gly Val Leu Tyr Gly

5

10

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はバクテリオファージT7の遺伝子5によりコードされるDNAポリメラーゼのアミノ酸配列の図による表示であり、パームおよびフィンガー領域、種々のジデオキシ抵抗性（DR）突然変異体の位置、A-Eと標識された領域の位置およびddNTP判別に関与する一つの部位の位置が示されている。

【図2】図2はDNAポリメラーゼIの3次元表示であり、領域A-Eの位置を示している。

*トポロジー：直線状

*

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

※

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

★

☆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

☆20

◆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

◆

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

【図3】図3はP o l I型DNAポリメラーゼのリボ選択性領域の図による表示であり、アミノ酸は一般的な一文字コードで示されている。図の左に最初のアミノ酸番号が示されており、およびデオキシヌクレオチドと比較したデオキシヌクレオチドに対する判別の程度は右に示されている。

【図4】図4は、大腸菌DNAポリメラーゼIのリボ選択性領域の修飾の図による表示である。

50 【図5】図5は、T7 DNAポリメラーゼのリボ選択

81

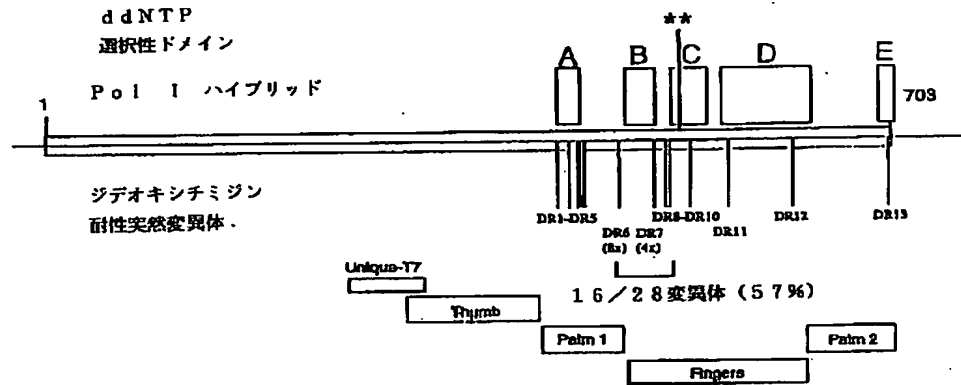
82

性領域の修飾の図による表示である。

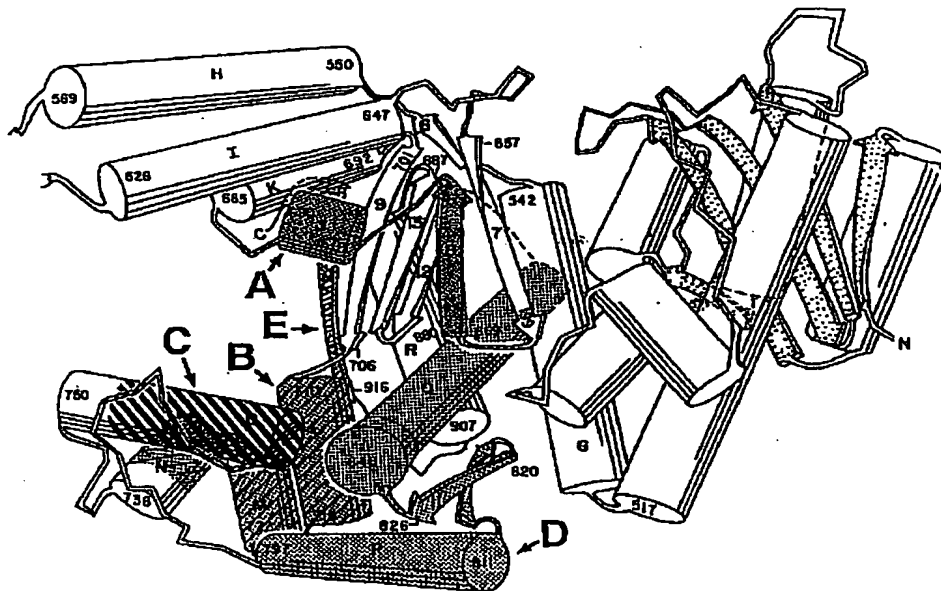
* 択性領域の修飾の図による表示である。

【図6】図6は、Taq DNAポリメラーゼのリボ選 *

【図1】



【図2】



| | 氨基酸序列 | 区别 |
|----------|---|----|
| T7 618 | R-D-N-A-K-T-F-I-Y-G-F-L-Y-G | 低 |
| Taq 659 | R-E-A-A-K-T-I-N-E-G-V-L-Y-G | 高 |
| | ↑ | |
| Taq C-Q1 | ○-□- D-N -○-□-□-□-□- F -○-□-□-□-○ | 高 |
| Taq C-Q2 | ○-□-□-○-○-□- F-I-Y - I-F -○-□-□-○ | 低 |
| Taq C-Q3 | ○-□-□-○-○-□-□- I-Y -□-□-□-○-○ | 低 |
| Taq C-Q4 | ○-□-□-○-□-□-□- I-F -□-□-□-□-○ | 高 |
| Taq C-Q5 | ○-□-□-□-○-□-□-□- Y -□-□-□-□-○ | 低 |
| | ↑ | |

【補正内容】

【補正内容】

【0025】本発明のDNAポリメラーゼはまた、TaboerおよびRichardson（上記文献）により記載されているような3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性またはBarnsにより（WO 92/06188）に記載されているようなTaq中の5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性のようなエキソヌクレアーゼ領域を除去または変更するように修飾してもよい。本発明のDNAポリメラーゼのd d NTPを判別する能力を変える突然変異は、好適には実質的にエキソヌクレアーゼ活性に影響しない；このことは、突然変異は酵素のポリメラーゼ領域内の、重合化の活性部位近くにおいて生じ、単に取り込まれた類似体をそのエキソヌクレアーゼ活性を介して除去するポリメラーゼの能力を減少させることによる判別の減少ではない。本発明の特に好適なDNAポリメラーゼは、BraithwaiteおよびIto（21 Nuc. Acid. Res. 787, 1993、ここに引例として含まれている、およびファミリーAと称されている）により記載されているようなPol I型ポリメラーゼ、およびBraithwaiteおよびItoにより記載されており、ファミリーBと称されるようなポリメラーゼ アルファまたはポリメラーゼII型DNAポリメラーゼである。BraithwaiteおよびItoにより記載されている他のポリメラーゼファミリーもまた本発明で使用するができる。特に、d NTP基質の結合部位近くの位置の極性、ヒドロキシ含有アミノ酸残基の存在が、効率的にジデオキシヌクレオチドを取り込むことができるポリメラーゼに重要

であることが見いだされた。理論に拘束されるわけではないが、この発見は、リボース部分の3'位にヒドロキシル基のないヌクレオチド(すなわちddNTP)の高い判別には、同時にこの重要部位のアミノ酸残基上にヒドロキシル基がないことを必要とするという、予期された結果と逆であると考えている。別の言い方をすれば、両方のヒドロキシル基の不在により作り出された隙間または穴の存在により類似体の判別がもたらされる。この結果を考えると、関係が薄いDNAポリメラーゼにおいてさえも重要な残基を発見する方法が提供される; ddNTPが結合する領域において極性基を持つ残基を非極性基に付加することは、ddNTPを判別するポリメラーゼの能力を減少させるための有用なアミノ酸変更の候補である。例えば、ラットDNAポリメラーゼb(ファミリーAまたはBと、たとえあるにしてもわずかな相同性しか持たないDNAポリメラーゼ)の272位のフェニルアラニンは、X線解析研究によりプライマー-テンプレートとの三成分複合体中でddCTPの3'位と接触していることが示されている(Pelletier et al., 264 *Science* 189, 1994)。本発明で説明された結果の知識は、ジデオキシヌクレオチドをより効率的に取り込むラットDNAポリメラーゼbの突然変異体のスクリーニングにおいてこの残基をチロシンに修飾することを論理的な選択にしている。したがって、当業者はここに提供された情報を用いて任意のDNAポリメラーゼの判別性の表現型を変えることができるであろう。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

【補正内容】

【0035】別の関連する観点においては、本発明は、一つまたはそれ以上(好適には2、3または4)のデオキシリボヌクレオチド三リン酸、上記のDNAポリメラーゼおよび第一の鎖停止剤を用いる、本質的に上に記載したようなDNA鎖のシーケンシングのための方法の特徴としている。DNAポリメラーゼはプライマーを伸長させて、伸長したプライマーの長さが異なる第一のDNA生成物の第一のシリーズを形成させ、各々の第一のDNA生成物はその伸長された末端に鎖停止剤を有し、および各々の第一のDNA生成物の分子の数は長さが20塩基未満しか異なっていない実質的にすべてのDNA生成物についてほとんど同じである。本方法はまた、ハイブリダイズした混合物中に第一の鎖停止剤と異なる濃度の第二の鎖停止剤を提供することを特徴としており、ここではDNAポリメラーゼは伸長されたプライマーの長さが異なる第二のDNA生成物の第二のシリーズを生成し、各々の第二のDNA生成物はその伸長末端に第二の鎖停止剤を有する。各々の第二のDNA生成物の分子の数は、長さが互いに1から20塩基しか異なっていない

実質的にすべての第二のDNA生成物についてほとんど同じであり、および該第二のDNA生成物と20塩基未満の長さの違いを有するすべての第一のDNA生成物の分子の数とは明らかに相違する。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正内容】

【0041】さらに別の観点においては、本発明は残基667にチロシンを有するテルムスアクアチカス(*Thermus aquaticus*) DNAポリメラーゼ、残基762にチロシンを有する大腸菌DNAポリメラーゼI、および大腸菌DNAポリメラーゼ残基762と類似の位置、例えば、アミノ酸配列KN₁N₂N₃N₄N₅N₆N₇YG(式中各々のNは独立して任意のアミノ酸である)のN₄位にチロシン残基を持つP₀₁ I型DNAポリメラーゼ(I)のような特定のDNAポリメラーゼを特徴としている。さらに、本発明は、配列KN₁N₂N₃N₄N₅N₆YG/Q(式中各々のNは独立して任意のアミノ酸である)を有し、残基N₁からN₇の一つはddNTPの判別性が減少されている(好適には非突然変異配列に比較して少なくとも20倍減少されている)ポリメラーゼを産生するように突然変異を起こされているDNAポリメラーゼアルファファミリーの特定のポリメラーゼを特徴としている。本発明はまたこれらのDNAポリメラーゼをコードする核酸も特徴としている。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0055

【補正方法】変更

【補正内容】

【0055】JoyceおよびSteitz, 63 *Ann. Rev. Biochem.* 777, 1994(本発明に対する従来の技術であるとは認められていない)は種々のDNAおよびRNAポリメラーゼの関係を議論している。DNAポリメラーゼの”パーム”(”フィンガー”よりも)サブドメインの3つの機能を示している—すなわち、触媒中心、プライマーの3'末端の結合部位およびdNTP結合部位。HIV-1逆転写酵素においてDNAポリメラーゼ阻害剤の結合に影響する突然変異は残基67-70付近であることが示されている。”また糖のヌクレオチド塩基の位置からは何等有用な結論を導き出せないが、クレノー断片およびdNTPリン酸基間の接触の同定において結晶性二成分複合体からの情報が役に立つであろう”とも述べられている。前のパラグラフにおいて”ポリメラーゼ-dNTP二成分複合体を形成できるが、そのような複合体は触媒的には応答能がない”と述べられている。さらにデータ”Phe 762の近くにデオキシリボースが配置されるであろう”および”モデルとして作られたテンプレ

ート鎖に近接するフィンガードメインに位置している Tyr 766 (クレノー断片ヘリックスO内)の突然変異体はデオキシおよびジデオキシヌクレオチド基質間の判別に影響する。．．．”ことが示されている。しかしながら、”クレノー断片において、三成分複合体中のdNTPの結合($K_{a(amp)}$)に反映される)に影響することが観察されている突然変異はフィンガーサブドメイン内または近くのポリメラーゼの裂け目の一側面に位置している。この様に同定された位置は遠くはヘリックスQのN末端(Arg 841およびAsn 845)、ヘリックスOの露出した面(Thr 766、Phe 762およびArg 754)および触媒中心近くの近接する残基(Asp 705およびGlu 710を含む。動力学的方法の利点は三成分複合体が証明されることである；しかしながら、上に議論したごとく、他の構造的証拠なしにテンプレート相互作用により開始される直接の影響を区別するのは不可能である。さらに、前にリストした側鎖はdNTP分子より大きな領域を包含しており、それ故、全部はそれと直接接触されない。これらの研究により示されたクレノー断片の領域はテンプレート鎖と広い範囲の接触をしていると考えられたので、上に述べられた残基のサブセットはdNTPと直接接触しており、一方、残りはテンプレートDNAを結合しているというのが妥当な説明である。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0057

【補正方法】変更

【補正内容】

【0057】Sousa et al. 364 *Nature* 593, 1993 (本発明にたいする従来の技術であるとは認められていない)はT7 RNAポリメラーゼの3次元構造およびその大腸菌DNAポリメラーゼIとの相同性が記載されている。彼らの観察結果は”KF(クレノー断片)のC末端要素(b-鎖14[残基916から928]およびC末端)は重合の間dNTPのデオキシリボース部分と接触し、rNTPおよびdNTP基質を判別する”ことを示唆すると記載している。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0058

【補正方法】変更

【補正内容】

【0058】ジデオキシチミジンのようなジデオキシヌクレオチドはT7ファージ増殖の強い阻害剤である。DNA合成の阻害はT7 DNA内へのジデオキシヌクレオチドの取り込みの結果であることが実験で示されている。ジデオキシヌクレオチドは非感染大腸菌には阻害を示さない。大腸菌DNA合成を阻害しないことへの説明はわからないが、細胞の取り込み、大腸菌DNAポリメ

ラーゼIIIによるそれらの取り込みに対する高いレベルの判別、三リン酸への不十分なリン酸化または効率のよい除去により説明できるであろう。どの場合においてもT7突然変異体ファージが生じることが観察され、寒天プレート上に約10³の頻度でジデオキシヌクレオチドを含む正常なプラークを得ることができる。多くのこれらの突然変異の位置が図1に示されている。それらは遺伝子5蛋白質内に残っている。突然変異体遺伝子5蛋白質は天然の遺伝子5蛋白質よりもdNTPをより強く判別する(数倍)。この変異の組のいくつかはdNTPのリボース部分の認識に重要なポリメラーゼの領域の輪郭をなしている。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0063

【補正方法】変更

【補正内容】

【0063】図4-6(および表2)を参照すると、この領域のアミノ酸の置換でポリメラーゼのリボ選択性を、大腸菌DNAポリメラーゼI型からT7 DNAポリメラーゼ型へおよび逆に変換することが可能なことが決定された。従って、Pol I型ポリメラーゼのこの領域を標的とした突然変異発生によりポリメラーゼのリボ選択性を著しく変えることができる。効果は少なくとも50-100倍であり、一般的には500倍以上である。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0068

【補正方法】変更

【補正内容】

【0068】

【表2】大腸菌DNAポリメラーゼI、T7 DNAポリメラーゼ、およびTaq DNAポリメラーゼ間のヘリックスO内のドメイン交換のddNTPに対する判別性への影響。3つのポリメラーゼの配列は最初の残基の番号とともに一番上に示されている。これら3つのポリメラーゼの保存配列の下にT7 DNAポリメラーゼ(T7)、大腸菌DNAポリメラーゼI(Pol I)およびTaq DNAポリメラーゼ(Taq)で特性付けられた突然変異体を示されており、突然変異を起こした残基に下線が付けられている。各々の突然変異体は実施例2に記載したSDS活性ゲル分析によるddNMPとdNMPの取り込みの相対速度が試験され、右側に結果が示されている。突然変異体T7 C-T8、Pol I C-K6およびTaq C-Q5がさらなる分析のため野生型蛋白質とともに精製された。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0069

【補正方法】変更

【0069】

【補正内容】

| 酵素 | 配列 | ddNTP判別 |
|------------|---|---------|
| Pol I 754 | RRSAKAINFGLIYG | 高い |
| Taq 658 | RRAAKTINFGVLYG | 高い |
| T7 517 | RDNAKTFIYGFLYG | 低い |
| Consensus | R AK G YG | |
| T7 WT | RDNAKTFIYGFLYG | 低い |
| T7 C-T2 | R <u>RS</u> AKA <u>IN</u> FG <u>L</u> IYG | 高い |
| T7 C-T3 | R <u>RS</u> AKTFIYGFLYG | 低い |
| T7 C-T4 | RDNAKA <u>IN</u> FGFLYG | 高い |
| T7 C-T5 | RDNAKA <u>I</u> IYGFLYG | 低い |
| T7 C-T6 | RDNAKT <u>FN</u> FGFLYG | 高い |
| T7 C-T7 | RDNAKT <u>FN</u> YGFLYG | 低い |
| T7 C-T8 | RDNAKT <u>FI</u> FGFLYG | 高い |
| Pol I WT | RRSAKAINFGLIYG | 高い |
| Pol I C-K1 | R <u>D</u> NAKT <u>FI</u> YGF <u>L</u> YG | 低い |
| Pol I C-K2 | RRSAKT <u>FI</u> YGLIYG | 低い |
| Pol I C-K3 | RRSAKT <u>F</u> NFGFLIYG | 高い |
| Pol I C-K4 | RRSAKA <u>I</u> IYGLIYG | 低い |
| Pol I C-K5 | RRSAKA <u>I</u> IYGLIYG | 高い |
| Pol I C-K6 | RRSAKAIN <u>Y</u> GLIYG | 低い |
| Taq WT | RRAAKTINFGVLYG | 高い |
| Taq C-Q1 | R <u>D</u> NAKTINFGVLYG | 高い |
| Taq C-Q2 | RRAAKT <u>FI</u> YGFLYG | 低い |
| Taq C-Q3 | RRAAKT <u>I</u> IYGVLYG | 低い |
| Taq C-Q4 | RRAAKT <u>I</u> IYGVLYG | 高い |
| Taq C-Q5 | RRAAKTIN <u>Y</u> GVLYG | 低い |

特異性残基 ↑

本発明のDNAポリメラーゼはDNAテンプレートの長さによるジデオキシヌクレオチド類似体およびデオキシヌクレオチド間を有意には判別しない。すなわち、これらのポリメラーゼは3' ヒドロキシル基を持つヌクレオチドに対しそれを持たないもの（すなわち、リボースの3' 位に2つの水素を持っている）を有意に判別しない。しかしながら、これらのポリメラーゼはマンガンまたは鉄の存在下においても、ヌクレオシドの他の位置の修飾を判別するであろう。例えば本ポリメラーゼはデオキシヌクレオチドと比べ、結合された蛍光基を持ついくつかのジデオキシヌクレオチド類似体を判別するであろう。しかしながら、本ポリメラーゼはジデオキシヌクレオチドへの修飾の存在または不在に基づいて、隣のまたは近接したヌクレオチドを異なる程度では判別しない。このように本ポリメラーゼはこれらの類似体を強く判別し、非修飾ジデオキシヌクレオチドに比較してDNAシークエンシング反応にはより高い濃度を必要とするが、近接するバンドの強度は依然として均一であろう。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0073

【補正方法】変更

【補正内容】

【0073】エキソヌクレアーゼ活性

本発明のDNAポリメラーゼは好適には50%未満、より好適には1%未満、および最も好適には0.1%未満の正常または天然に付随するレベルのエキソヌクレアーゼ活性を持っている（ポリメラーゼ分子当たりの活性の量）。正常または天然に付随するレベルとは例えば非修飾T7型ポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性を意味している。以下に記載したようなChase et al., (249 J. Biol. Chem., 4545, 1974)の方法の改良法により測定された、ポリメラーゼのmg当たりに通常付随する活性は約5000単位のエキソヌクレアーゼ活性である。エキソヌクレアーゼはテンプレートに間違っただ塩基対生成されている新しく合成された塩基を切り出すことによりDNA合成の忠実度を上げる。そのような付随エキソヌクレアーゼ活性はDNAシークエンシング反応の質に有害であろう。ヌクレオチド濃度が落ちた場合、ポリメラーゼ活性はエキソヌクレアーゼ活性と同じような速度まで遅くなり、その結果全体でのDNA合成がなくなるか、または合成されたDNAの分解さえ起こるので、付随エ

キソヌクレアーゼ活性は反応に加えなければならないヌクレオチド前駆体の最小必要濃度を上げることになる。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0075

【補正方法】変更

【補正内容】

【0075】理想的なシークエンシング反応はゲル全体を通して均一の強度のバンドを与える断片を生成する。このことはすべての放射活性断片にたいしX線フィルムで最適な暴露を得るために必須である。もし放射活性バンドの強度が変化していれば、より薄くなったバンドは検出されないであろう。全ての断片に均一な放射活性強度を得るには、DNAポリメラーゼはDNA上の各々の位置で同じ時間間隔を費やさなければならず、任意の位置でのヌクレオチドの付加または除去に優先を示してはならない。このことは、もしDNAポリメラーゼに付随するエキソヌクレアーゼがなければ起こり、そのためそれはテンプレートに沿った各々の位置で鎖停止ヌクレオチドを取り込むただ一回の機会を持っているであろう。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0076

【補正方法】変更

【補正内容】

【0076】短いプライマー

本発明のDNAポリメラーゼは好適には10塩基またはそれ未満、(より長いものも同様に)、最も好適には4-20塩基(例えば6塩基、これは3つのグループで使用でき18-merと等価物を形成する)のプライマーを利用することができる。短いプライマーを利用できる能力はDNAシークエンシングに多くの重要な利点を提供する。より短いプライマーは通常の17-merプライマーより安価であり、合成がより容易である。それらはより速くDNAテンプレート上の相補的部位にアニールし、そのためシークエンシング反応をより速くする。さらに、DNAシークエンシングに小さな(例えば、6または7塩基)オリゴヌクレオチドプライマーを利用する能力は、長いDNA断片のシークエンシングにそれでは不可能な戦略を可能にする。例えば、80-4000ランダムヘキサマーを含むキットが発生でき、そのどれもがクロニングベクター内のどの部位とも相補的でない。統計的には80のヘキサマー配列の一つが配列決定されるべきDNA断片に沿って平均50塩基毎に生じるであろう。3000塩基の配列の決定にはただ5回のシークエンシングサイクルしか必要としないであろう。第一に、"普遍的"プライマー(例えば、New Engl and Biolabs #1211、配列5'GTAAACGAACGCCAGT3')が挿入物の一つの末端の約600塩基の配列に使用されるであろう。このシークエンシング反応の結果を用いて、

決定された配列の末端近くの領域に相同的な新しいプライマーがキットから拾い上げられるであろう。第二のサイクルでは、次の600塩基の配列がこのプライマーを用いて決定されるであろう。この過程の5回の繰返しにより、サブクロニングを必要とせず、および新規のオリゴヌクレオチドプライマーの化学的合成なしに3000塩基の完全な配列が決定されるであろう。そのような短いプライマーの使用はシークエンシング反応にT7の遺伝子2、5および遺伝子4タンパク質を含ませることにより促進されるであろう。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0079

【補正方法】変更

【補正内容】

【0079】マンガン存在下ではT7 DNAポリメラーゼおよび大腸菌DNAポリメラーゼIによる判別は減少する; T7 DNAポリメラーゼでは3.7から1へ減少し、および大腸菌DNAポリメラーゼIでは550から3.9に(d d ATPに対して)減少した。出願者が最初に、唯一の二価カチオンとしてマグネシウムイオンの存在下100未満の連続移動性を持ち(プライマー-テンプレートから解離する前に与えられたプライマーから伸長された平均の長さとして定義される; 逆転写酵素はこの定義によると約150-200の連続移動性を持っており、T7 DNAポリメラーゼはこれより大きい連続移動性を持っている)、d d NMPの取り込みに対し100倍未満の判別を行うDNAポリメラーゼを提供した。対照的に、Taqのような既知のDNAポリメラーゼのほとんどは100未満の連続移動性を持ち、d d NMPの取り込みに対し100倍以上の判別を行う。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0081

【補正方法】変更

【補正内容】

【0081】しかしながら、均一の強度のバンドを与えおよびより少ないd d NTPの使用を可能にするために、急速に循環したd d NMPを効率的に取り込むポリメラーゼがより良好である。そのようなポリメラーゼが低いエキソヌクレアーゼ活性を持つかまたは全く持たず、および加ピロリン酸分解によるバンドの分解を防ぐためピロホスファターゼを加えるのもまた好適である。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0082

【補正方法】変更

【補正内容】

【0082】唯一の二価カチオンとしてマグネシウムでDNAシークエンシング反応を実施できることも好適で

ある(すなわち、マンガン非存在下)。第一に、ポリメラーゼはマグネシウムに比べマンガンでより不活性になりがちである(例えば、Taborおよび Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4076-4080(1989)参照)。第二に、ポリメラーゼは広い範囲のマグネシウム濃度で活性である一方、最適活性はほとんどの場合に非常に鋭く、低い最適マンガン濃度が必要とされる(同上)。および、最適マンガン濃度では、ポリメラーゼの活性ははるかに低いようなより高い濃度の場合よりも d d N T P に対する判別の減少への効果が小さい。第三に、マンガンはキットに含ませるには都合のよい金属イオンではない; 容易に沈澱を生じる(特により高い pH で)。第四に、マンガンがどの好熱性ポリメラーゼに対しても d d N T P の判別を減少させるための金属イオンとして効果があるのかどうか明かではない(すなわち、より高い温度で)。

【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0084

【補正方法】変更

【補正内容】

【0084】” DNAポリメラーゼ I は低い連続移動性を持っており、10ヌクレオチド未満の取り込み後に解離する。d d N T P 非存在下の DNA 合成の間に部位から酵素が解離する頻度およびその部位での d d N M P の取り込みに対する判別の程度の間に強い関係がある(未発表データ)。このことは、DNAポリメラーゼ I は連続移動性合成の間は d N M P および d d N M P を類似の速度で取り込む; しかしながら、合成が連続移動性でない場合、d N M P は d d N M P に優先して取り込まれることを示唆している。このモデルは T 7 DNAポリメラーゼと比較しての DNAポリメラーゼ I による d d N M P 取り込みのより大きな変異を説明できる、なぜなら、後者は前者に比べ2桁大きな値の連続移動性を持っているからである(引用省略)。

【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0085

【補正方法】変更

【補正内容】

【0085】このように、我々はここに記載した突然変異体が突然変異体酵素の連続移動性を本当に増加させるという証拠を観察していないので、大腸菌 DNAポリメラーゼ I および T a q DNAポリメラーゼでの本発明の結果は驚くべきものである。

【手続補正19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0086

【補正方法】変更

【補正内容】

【0086】好熱性ポリメラーゼ

d d N T P に対する判別が 100 倍以下である好熱性ポリメラーゼが特に本発明で有用である。さらに、唯一の二価カチオンとしてのマグネシウムの存在下 d d N T P に対する判別が 100 倍以下であり、好適には一つのプライマー-テンプレートから別のものへのサイクルが 1 秒当たり 1 回またはそれ以上のものが有用である。好熱性ポリメラーゼは 60℃ 以上で 15 分の反応において最適 DNAポリメラーゼ活性を持つポリメラーゼとして定義される。

【手続補正20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0087

【補正方法】変更

【補正内容】

【0087】均一バンド強度

マンガンは d d A T P に対するクレノー断片の判別を 550 から 3.9 に減少させるが、Tabor および Richards on (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4076-4080(1989)) は個々のバンドの強度にまだ広範囲の変異があること(図2参照 同上)を示している。このように、T 7

DNAポリメラーゼから離れても、本発明はクレノー断片のように急速に循環するポリメラーゼおよび唯一の二価カチオンとしてのマグネシウムの存在下でも(ほとんどのポリメラーゼの活性に好適な条件、下記参照)均一な強度を持つバンドを産生する好熱性生物由来のポリメラーゼを初めて提供する。急速に循環する酵素は以下に記載した本分野では既知の方法により決定できる。

【手続補正21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0091

【補正方法】変更

【補正内容】

【0091】2. ポリメラーゼアルファファミリー
(ポリメラーゼIIファミリーとも呼ばれる)

Delarue et al., *Protein Engineering* 3, 461-467(1990) はポリメラーゼの二つのファミリー(ポリメラーゼ I ファミリーおよびポリメラーゼアルファファミリー)が三つの共通のモチーフを共有していることを示している。彼らが”モチーフ B”と呼んだ領域にジデオキシリボースの特異性に関する同定された残基が含まれている。この領域はポリメラーゼ I ファミリー中、配列 K N₁N₂N₃N₄N₅N₆N₇Y G (ここで N_i は特異的残基であり: もし N_i がフェニルアラニンであれば、高い判別性であり、もし N_i がチロシンであれば低い判別性である)により特徴付けられる。ポリメラーゼアルファファミリーにおいては、配列は K N₁N₂N₃N₄N₅N₆Y G (保存残基の間では塩基が一つ少ない)。従ってポリメラーゼ I 型酵素とちょうど同じにこのモチーフ(リジン(K) およびチロシン(Y)の間)内の残基の変化がこ

これらのポリメラーゼの ddNTP に対する判別度を減少
させるであろう。これらの残基は以下の様である：

【表 4】

| | |
|---|-----------------|
| 大腸菌 DNA ポリメラーゼ II | Ile494-Phe499 |
| PRD 1 DNA ポリメラーゼ | Leu341-Ser346 |
| Φ 2 9 DNA ポリメラーゼ | Leu384-Leu389 |
| M2 DNA ポリメラーゼ | Leu381-Leu386 |
| T 4 DNA ポリメラーゼ | Ile558-Leu563 |
| <u>テルミュオコッカス リトラリス</u> | |
| (<i>Thermuococcus litoralis</i>) DNA ポリメラーゼ (V e n t) | Leu492-Tyr497 |
| <u>ピロコッカス フリウサス (<i>Pyrococcus feriosus</i>)</u> | |
| DNA ポリメラーゼ | Leu489-Phe494 |
| <u>スルフォロブス ソルファタリカス</u> | |
| (<i>Sulfolobus solfataricus</i>) DNA ポリメラーゼ | Val604-Thr609 |
| ヒト DNA ポリメラーゼ アルファ | Leu951-His956 |
| <u>S. セレビジエ (<i>cerevisiae</i>) DNA ポリメラーゼ I</u> | |
| (アルファ) | Leu945-His950 |
| S. ポンベ (<i>pombe</i>) DNA ポリメラーゼ I (アルファ) | Leu931-His936 |
| <u>ドロソフィラ メラノガスター (<i>Drosophila melanogaster</i>)</u> | |
| DNA ポリメラーゼ アルファ | Leu960-His965 |
| <u>トリパノソーマ ブルーセイ (<i>Trypanosoma brucei</i>)</u> | |
| DNA ポリメラーゼ アルファ | Leu845-His850 |
| ヒト DNA ポリメラーゼ デルタ | Val695-Val700 |
| ウシ DNA ポリメラーゼ デルタ | Val694-Val699 |
| <u>S. セレビジエ (<i>cerevisiae</i>) DNA ポリメラーゼ III</u> | |
| (デルタ) | Ile702-Val707 |
| S. ポンベ (<i>pombe</i>) DNA ポリメラーゼ III (デルタ) | Val681-Val686 |
| 熱帯熱マラリア DNA ポリメラーゼ (デルタ) | Ile692-Val697 |
| <u>S. セレビジエ (<i>cerevisiae</i>) DNA ポリメラーゼ II</u> | |
| (イプシロン) | Val82-Phe830 |
| <u>S. セレビジエ (<i>cerevisiae</i>) DNA ポリメラーゼ R e v 3</u> | |
| 単純ヘルペスウイルス タイプ 1 DNA ポリメラーゼ | Leu1087-Thr1092 |
| エキンヘルプスウイルス タイプ 1 DNA ポリメラーゼ | Val812-Val817 |
| 水痘帯状ヘルペスウイルス DNA ポリメラーゼ | Val813-Val818 |
| エプスタインバーウイルス DNA ポリメラーゼ | Val776-Val781 |
| ヘルペスウイルス サイミリ DNA ポリメラーゼ | Cys682-Val687 |
| ヒトサイトメガロウイルス DNA ポリメラーゼ | Val671-Val676 |
| マウスサイトメガロウイルス DNA ポリメラーゼ | Val811-Phe816 |
| ヒトヘルペスウイルス タイプ 6 DNA ポリメラーゼ | Val717-Phe722 |
| 湖水ナマズウイルス DNA ポリメラーゼ | Ile667-Val672 |
| クロレラウイルス DNA ポリメラーゼ | Ile750-His755 |
| 鶏頭ウイルス DNA ポリメラーゼ | Ile586-Val591 |
| ワクシニアウイルス DNA ポリメラーゼ | Ile648-Val653 |
| コリストニューラ ビエニス (<i>Choristoneura biennis</i>) | Ile637-Val642 |
| DNA ポリメラーゼ | Ile669-Leu674 |
| <u>オートグラフア カリホルニカ (<i>Autographa californica</i>)</u> | |
| 核多面化ウイルス (A c M N P V) DNA ポリメラーゼ | Arg606-Ile611 |
| マイマイガ核多面化ウイルス DNA ポリメラーゼ | Arg624-Ile629 |
| アデノウイルス-2 DNA ポリメラーゼ | Leu696-Leu701 |
| アデノウイルス-7 DNA ポリメラーゼ | Leu762-Leu767 |
| アデノウイルス-12 DNA ポリメラーゼ | Leu694-Leu699 |

| | |
|--|---------------|
| S-1 トウモロコシDNAポリメラーゼ | Leu618-Leu623 |
| カリオ ニューロスボラ インターメディア | |
| (<i>Kalio neurospora intermedia</i>) DNAポリメラーゼ | Leu776-Leu777 |
| p A I 2 アスコボラス イマーサス | |
| (<i>Ascobolus immersus</i>) DNAポリメラーゼ | Leu951-leu956 |
| p C L K 1 クラビセプス プルブレア | |
| (<i>Claviceps purpurea</i>) DNAポリメラーゼ | Leu831-Leu836 |
| マランハル ニューロスボラ クラッサ | |
| (<i>Maranhar neurospora crassa</i>) DNAポリメラーゼ | Leu752-Leu757 |
| p E M アガリカス ビトルキス | |
| (<i>Agricus bitorquis</i>) DNAポリメラーゼ | Leu573-Leu578 |
| p G K L 1 クライベロマイセス ラクチス | |
| (<i>Kluyveromyces lactis</i>) DNAポリメラーゼ | Ile785-Leu790 |
| p G K L 2 クライベロマイセス ラクチス | |
| (<i>Kluyveromyces lactis</i>) DNAポリメラーゼ | Ile770-Gly776 |
| p S K L サッカロマイセス クライベリ | |
| (<i>Saccaromyces kluyveri</i>) DNAポリメラーゼ | Ile775-Gly781 |

上述のポリメラーゼのうち代表的なものについて、対応する位置のアミノ酸残基を以下に示す。

【手続補正22】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0141

【補正方法】変更

【補正内容】

【0141】DNAポリメラーゼの修飾がddNTPを判別する能力を減少させた（すなわち、ジデオキシヌクレオチドをより効率よく取り込む）かどうかを決定するために本試験を使用するには、同一の単位数の修飾および非修飾DNAポリメラーゼが上記のddNTPとdNTPを種々の比で含む一連の反応で使用されるであろう。二つの酵素に対しddNTPとdNTPが同一の比でジデオキシ停止断片の平均の長さが比較される。もし修飾がDNAポリメラーゼがジデオキシヌクレオチドをより効率よく取り込む結果を与えるなら、dNTP対ddNTPが同じ比では非修飾DNAポリメラーゼを使用した反応のジデオキシ停止断片の平均の長さに比較して修飾DNAポリメラーゼを使用したものの方がより短いであろうし、一方、もし修飾によりDNAポリメラーゼがddNTPをより判別できるようになるなら修飾DNAポリメラーゼを用いた反応で平均の長さがより長くなるであろう。

【手続補正23】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0173

【補正方法】変更

【補正内容】

【0173】以下の実施例は異なるDNAポリメラーゼにより合成されたジデオキシ停止断片から作り出されるバンド強度の均一性を試験するために提供されるものである。

実施例13. 一本鎖M13 DNA-5' ³²P-標識40-mer複合体およびゲル電気泳動を用いるジデオキシヌクレオチド取り込みの均一性の決定

この実施例ではジデオキシヌクレオチド取り込みの均一性が一本鎖M13 DNAテンプレートで伸長された5' ³²P-末端標識プライマーで測定される。三つの活性がジデオキシ停止断片のバンド強度の変異を起こすことができる。一つはエキソヌクレアーゼ活性であり、いくつかの配列では優先的である；これは化学的または遺伝学的手段により選択的に活性を除去することにより避けられる（例えば、TaborおよびRichardson 264 *J. Biol. Chem.* 6447, 1989参照）。第二は加ピロリン酸分解であり；これはDNA合成の間に蓄積され、加ピロリン酸分解に必要な基質であるピロリン酸を分解するピロホスファターゼを反応混合物中に含ませることにより容易に避けることができる。第三はジデオキシヌクレオチドの取り込みにおける配列特異的変異である。バンド強度の変異はDNA配列分析に有害であり、決定されるDNA配列の正確性を減少させる。この試験はジデオキシヌクレオチドをより効率的に取り込むであろう突然変異体DNAポリメラーゼを含む異なるDNAポリメラーゼにより合成された断片中のバンド強度の変異性の程度を比較するために計画された。

フロントページの続き

| (51) Int. Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|----------------------------|------|-----------|-----|--------|
| C 1 2 Q 1/68 | | Z 9453-4B | | |
| /(C 1 2 N 9/12 | | | | |
| C 1 2 R 1:01) | | | | |
| (C 1 2 N 9/12 | | | | |
| C 1 2 R 1:07) | | | | |
| (C 1 2 N 9/12 | | | | |
| C 1 2 R 1:19) | | | | |

(72)発明者 スタンレー・テーバー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02138,
ケンブリッジ, ローウェル・ストリート
9エイ

(72)発明者 チャールズ・シー・リチャードソン
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02167,
チェスナット・ヒル, チェスナット・ヒ
ル・ロード 78